

Vergleichende Untersuchungen mit
komplementären Oligonukleotiden an
5S rRNS und 5S rRNS-Protein-Komplexen
aus **Escherichia coli** und
Bacillus stearothermophilus

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Biologie (23)
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Paul Wrede
aus Berlin

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549013_0045

Vergleichende Untersuchungen mit
komplementären Oligonukleotiden an
5S rRNS und 5S rRNS-Protein-Komplexen
aus **Escherichia coli** und
Bacillus stearothermophilus

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Biologie (23)
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Paul Wrede
aus Berlin

1. Gutachter: Prof. H. G. Wittmann

2. Gutachter: Prof. E. R. Lochmann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.5.1976



verlegt von
Paul Wiede
aus Bonn

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Die Proteinbiosynthese	1
1.2. Struktur und Funktion der 5S RNS und 5,8S RNS	3
1.3. Oligonukleotidbindung an RNS	7
1.4. Aufgabenstellung	8
2. Methoden und Material	9
2.1. Polykleotid-Phosphorylase	9
2.2. Synthese von Oligonukleotiden	10
2.3. Gleichgewichtsdialyse	13
2.4. Darstellung der 50S Ribosomen aus <u>E.coli</u> und <u>Bac.stearothermophilus</u>	15
2.5. Isolierung der 5S RNS und Gewinnung der 5S RNS-Protein Komplexe	15
2.6. Polyacrylamidgel-Elektrophorese	19
2.7. Herkunft der Materialien	21
3. Ergebnisse	23
3.1. Synthese der Tri- und Tetranukleotide ..	23
3.2. Charakterisierung der 5S RNS und 5S RNS-Proteinkomplexe aus <u>E.coli</u> und <u>Bac.stearothermophilus</u>	30
3.3. Bindungsdaten der Tripletts und Tetramere an <u>E.coli</u> 5S RNS und 5S RNS- Proteinkomplex	32
3.4. Bindungsdaten der Tripletts und Tetramere an <u>Bac.stearothermophilus</u> 5S RNS und 5S RNS-Protein-Komplex	51

3.5.	Untersuchungen mit Oligonukleotiden am 5S RNS-Protein-Komplex von <u>Bac.stearo- thermophilus</u> in Gegenwart von GTP.....	67
3.6.	Vergleich der Bindungsdaten der Oligonu- kleotide an der 5S RNS und am 5S RNS- Protein-Komplex von <u>E.coli</u> und <u>Bac.stearothermophilus</u>	72
3.7.	Vergleich der Bindungsdaten am 5S RNS- Protein-Komplex von <u>E.coli</u> und <u>Bac. stearothermophilus</u> in Gegenwart von GTP .	75
3.8.	Bindungsversuch mit <u>E.coli</u> ribosomalen Proteinen an 5S RNS und 5,8S RNS aus Hefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	76
4.	Diskussion der Ergebnisse	82
4.1.	Vergleich der freien 5S RNS von <u>E.coli</u> und <u>Bac.stearothermophilus</u>	82
4.2.	Vergleich der Bindungsdaten mit enzyma- tischen Spaltungen und chemischen Modifi- zierungen an der 5S RNS <u>E.coli</u>	85
4.3.	Vergleich der Oligonukleotidbindungsbe- reiche mit vorgeschlagenen 5S RNS-Modellen	86
4.4.	Bedeutung der Bindungsdaten am 5S RNS-Protein-Komplex	89
4.5.	Struktur und Funktion der 5,8S RNS Hefe ..	92
5.	Zusammenfassung und Ausblick	94
6.	Verzeichnis der Abkürzungen	95
7.	Literaturverzeichnis	96
	Danksagung	103
	Lebenslauf	104

1. Einleitung

1.1. Die Proteinbiosynthese

Die Proteinbiosynthese findet sowohl in prokaryontischen als auch in eukaryontischen Zellen an Ribosomen statt. Für die Übersetzung der genetischen Information nach den Regeln des Triplet-Codes sind drei verschiedene RNS-Arten notwendig:

1. mRNS: messenger RNS; sie übernimmt die genetische Information von der DNS und hat die Aufgabe, diese Information zu den Ribosomen weiterzuleiten. Sie bestimmt die Reihenfolge zur Verknüpfung der Aminosäuren. Jede Aminosäure wird durch ein Triplet codiert.
2. tRNS: transfer RNS; sie bringt die Aminosäuren aus dem Cytoplasma zum Ribosom und tritt dort mit der mRNS in Wechselwirkung. Jedem Codon auf der mRNS entspricht eine bestimmte tRNS.
3. rRNS: ribosomale RNS; sie ist ein für die Struktur des Ribosoms notwendiger Bestandteil und daher auch für die Funktion des Organells sehr wichtig.

Die Ribosomen sind die Orte der Proteinbiosynthese. Die Ribosomen von Pro- und Eukaryonten unterscheiden sich in dem mengenmäßigen Anteil von Protein und rRNS; bei Prokaryonten 66 % RNS und 34 % Protein und bei Eukaryonten etwa 50 % RNS und 50 % Protein. Man charakterisiert die Ribosomen und die rRNS nach ihren Sedimentationswerten. So haben Prokaryonten 70S Ribosomen, die aus zwei Untereinheiten, nämlich 50S und 30S, bestehen, während die Eukaryonten aus 60S und 40S Untereinheiten zusammengesetzte 80S Ribosomen besitzen.

Sowohl die Pro- als auch die Eukaryonten-Ribosomen setzen sich aus zahlreichen Proteinen und aus mehreren RNS-Molekülen zusammen. Die beiden Ribosomenklassen (Pro- bzw.

Schema: Aufbau des E.coli 70S Ribosoms und des Hefe
80S Ribosoms

Aufbau des E.coli 70S Ribosoms

<u>70S MW: $2,7 \times 10^6$ Daltons</u>	
Erhöhung der Mg^{++} - Konzentration	Erniedrigung der Mg^{++} - Konzentration
	
<u>50S MW: $1,8 \times 10^6$ Daltons</u>	<u>30S MW: $0,9 \times 10^6$ Daltons</u>
<u>23S RNS MW: $1,1 \times 10^6$ Daltons</u>	<u>16S RNS MW: $0,6 \times 10^6$ Daltons</u>
<u>5S RNS MW: $4,2 \times 10^4$ Daltons</u>	
<u>34 Proteine</u>	<u>21 Proteine</u>
<u>MW: $9-30 \times 10^3$ Daltons</u>	<u>MW: $10-65 \times 10^3$ Daltons</u>

Aufbau des Hefe 80S Ribosoms

<u>80S MW: $3,68 \times 10^6$ Daltons</u>	
Erhöhung der Mg^{++} - Konzentration	Erniedrigung der Mg^{++} - Konzentration
	
<u>60S MW: $2,2 \times 10^6$ Daltons</u>	
<u>26S RNS MW: $1,27 \times 10^6$ Daltons</u>	<u>18S RNS MW: $0,65 \times 10^6$ Daltons</u>
<u>5,8S RNS MW: $5,5 \times 10^4$ Daltons</u>	
<u>5S RNS MW: $4,2 \times 10^4$ Daltons</u>	
<u>40 Proteine</u>	<u>30 Proteine</u>
<u>MW: $3,0 \times 10^4$ Daltons</u>	<u>MW: $1,0-4,6 \times 10^4$ Daltons</u>

Eukaryonten) unterscheiden sich u.a. in der Zahl der RNS-Moleküle in der großen Untereinheit. In der 50S Untereinheit sind die 23S RNS und die 5S RNS vorhanden. In der 60S Untereinheit kommen diese RNS-Moleküle vor: Neben der 26S RNS und der mit dieser über Wasserstoffbrücken verbundene 5,8S RNS, gibt es noch die 5S RNS (zusammenfassende Übersichten von NOMURA et al. 1974; PONGS et al., 1974; WITTMANN, 1976). (vgl. Schema, S. 2)

1.2. Struktur und Funktion der 5S RNS und 5,8S RNS

Die ribosomale 5S RNS ist zuerst von ROSSET und MONIER (1963) als Bestandteil der 50S ribosomalen Untereinheit identifiziert worden. In Ribosomen von allen bis jetzt untersuchten Organismen konnte eine 5S RNS nachgewiesen werden. Die Primärstruktur der 5S RNS aus mehreren Organismen ist bereits bekannt:

Prokaryonten

Enterobacteriaceae

E.coli (BROWNLEE et al., 1968)

Proteus vulgaris (FISCHEL und EBEL, 1975)

Bacillaceae

Bac.stearothermophilus (MAROTTA et al., 1973)

Bac.megaterium (PRIBULA et al., 1974)

Bac.licheniformis (RAUÈ et al., 1975)

Pseudomonadaceae

Pseudomonas fluorescens (DUBY und WEISSMAN, 1971)

Photobacterium 8265 (WOESE et al., 1975)

Chroococcales

Anacystis nidulans (CORRY et al., 1974)

Eukaryonten

Humane KB-Zellen (FORGET und WEISSMAN, 1967)
Küken (Huhn) (BROWNLEE und CARTWRIGHT, 1975)
Xenopus laevis, Ovarien, Nieren (BROWNLEE et al., 1972) (WEGENEZ et al., 1972)
Drosophila melanogaster (BEHANOU und JORDAN, 1976)
Saccharomyces carlsbergensis (HINDLEY und PAGE, 1972)
Torulopsis utilis (NISHIKAWA und TAKEMURA, 1974)
Chlorella pyrenoidosa (JORDAN et al., 1974)

Die 5S RNS-Arten der Prokaryonten sind in ihrer Struktur und Funktion verwandt. Dies konnte u.a. mit der Rekonstitution von 50S Untereinheiten von Bac.stearothermophilus gezeigt werden. So können die 5S RNS aus E.coli, Proteus vulgaris, Bac.subtilis, Micrococcus luteus, Staphylococcus aureus, Pseudomonas fluorescens, Azotobacter vinelandii und Halobacterium cutirubrum in das 50S Ribosom von Bac.stearothermophilus eingebaut werden. Diese heterogenen Ribosomen sind im Poly(U)-abhängigen Proteinsynthesesystem aktiv, während die getesteten eukaryontischen 5S RNS-Arten nicht in das bakterielle Ribosom eingebaut werden (NOMURA und ERDMANN, 1970; WREDE und ERDMANN, 1973).

Betrachtet man die Primärstrukturen der prokaryontischen 5S RNS-Arten, so kann man sieben Regionen, die mit A-G bezeichnet werden, unterscheiden. Die Einteilung in diese Regionen geschieht nach dem Grade der Homologie. Als Region bezeichnet man jeweils charakteristische Abschnitte auf der 5S RNS, die hinsichtlich ihrer Basensequenz entweder sehr stark erhalten geblieben sind oder sehr stark variieren. Der Homologiegrad wird in Prozent ausgedrückt, und zwar bedeuten 100 % Homologie, daß eine Region aus einer vollständig erhaltenen Basensequenz besteht. Eine Homologie von 20 % bedeutet, daß ein Fünftel der Sequenz, sei sie zusammenhängend oder verteilt, innerhalb einer Region erhalten geblieben ist (s. Abb. 5-8)(ERDMANN, 1976).

So ist die A-A'-Region in Bezug auf ihre Primärstruktur nur in Pos. Nr. 7, Guanin, konserviert, während sie in ihrer Sekundärstruktur innerhalb der Prokaryonten übereinstimmt. Die B-Region ist nur in Pos. Nr. 23, 24, die zwei Guanine enthalten, konserviert, während diese Region mit 22 % Homologie sonst als sehr variabel angesehen werden kann. Region C ist bei allen Bakterien gleich lang, nämlich 14 Nukleotide. Sie beginnt mit der stark konservierten C-A-C-C-Sequenz, die zu 100 % erhalten geblieben ist. Die Homologie der C-Region beträgt 77 %. Diese starke Konservierung der Sequenz ist sicherlich für die Proteinerkennung und -bindung bedeutsam.

Am Anfang der D-Region befindet sich die C-C-G-A-A-C-Sequenz, die auch bei allen Bakterien vorkommt und wahrscheinlich sehr wichtig für die tRNS-Wechselwirkung im Ribosom ist (ERDMANN et al., 1973). Ungefähr in der Mitte der D-Region, zwischen Pos. Nr. 60-70, liegt ein sehr variabler Teil von 5 Nukleotiden. Um Pos. Nr. 74 befindet sich eine stark konservierte U-G-G-U-Sequenz, die komplementär zum Pu-C-C-A-Ende der tRNS ist. Die gesamte D-Region hat eine Homologie von 67 %. An die D-Region schließt sich die basengepaarte E-Region mit vier Basenpaaren an, die bei allen Bakterien identisch sind. Die E- und E'-Regionen werden durch eine "Haarnadelschleife" ("hairpin-loop"), der F-Region verbunden. Dieser Teil der Sequenz ist schwach konserviert (39 % Homologie) und besteht aus drei oder vier Nukleotiden. Die G-Region stellt die Verbindung zwischen A' und E'-Region dar. Dieser Teil der Sequenz ist bis zur Pos. Nr. 100 konserviert und im Rest sehr variabel. Die Länge dieser Region variiert innerhalb der Prokaryonten (ERDMANN, 1976). Bei Bac-stearothermophilus befindet sich in dieser Region die Sequenz A-A-G-A-G, die wahrscheinlich von einem Enzym erkannt werden kann, das 16 Nukleotide weiter, also gerade am 3'-Ende spaltet. Dieses Enzym M5 ist aus Bac-subtilis isoliert worden und schneidet die 5S RNS-Vorstufe zur nativen 5S RNS zurecht (PACE et al., 1973).

Die eukaryontischen 5S RNS-Arten lassen sich auch in ein solches Modell einordnen, und sie sind untereinander weit mehr konserviert als die prokaryontischen. Die pro- und eukaryontischen 5S RNS-Arten unterscheiden sich in ihren Primärstrukturen beträchtlich, so daß man von zwei sehr unterschiedlichen Klassen von 5S RNS sprechen kann (WREDE und ERDMANN, 1973; ERDMANN, 1976).

Bei den Eukaryonten kommt in der großen ribosomalen Untereinheit, wie erwähnt, neben der 5S RNS noch eine 5,8S RNS vor (UDEM et al., 1971). Die 5,8S RNS Hefe ist in ihrer Primärstruktur bekannt und enthält neben den vier gewöhnlichen Basen auch Pseudouridin. Die Länge des 5,8S RNS-Moleküls beträgt 158 Nukleotide (RUBIN, 1973).

Die 5,8S RNS läßt sich in ein ähnliches Homologieschema wie die 5S RNS bringen (ERDMANN, 1976). Eine 5,8S RNS ist bei allen untersuchten Eukaryonten gefunden worden. Sie variiert in ihrer Länge; so ist sie bei Drosophila melanogaster genau so groß wie die 5S RNS (RUBIN und HOGNESS, 1975; NAZAR et al., 1976). Ihre Funktion im eukaryontischen Ribosom ist noch unklar. Die Synthese der 5,8S RNS geschieht ähnlich wie die Synthese der prokaryontischen 5S RNS; denn die Sistrone für diese RNS befinden sich zwischen den Cistronen der beiden großen ribosomalen RNS (UDEM und WARNER, 1972).

Die 5S RNS bei Prokaryonten spielt eine große Rolle für die biologische Aktivität der 50S ribosomalen Untereinheit; denn ohne 5S RNS rekonstituierte 50S Ribosomen sind in allen Funktionen inaktiv (ERDMANN et al., 1971). Es wurde vorgeschlagen, daß das Uracil am 3'-Ende der 5S RNS wichtig für den Peptidyltransfer im Ribosom ist (RAACKE, 1971). Diese Hypothese konnte widerlegt werden, indem in einem Rekonstitutionsversuch eine 5S RNS ohne das am 3'-Ende befindliche Uracil eingebaut werden konnte und dennoch ein aktives Ribosom ergab (ERDMANN et al., 1971a).

Sowohl von E.coli als auch Bac.stearothermophilus konnten spezifische 5S RNS-Protein-Komplexe, die drei bzw. zwei Proteine enthalten, isoliert werden (HORNE und ERDMANN, 1972). Erstaunlicherweise sind diese RNS-Protein-Komplexe enzymatisch aktiv; sie können GTP und ATP in einer nicht-kompetitiven Art und Weise zu den entsprechenden Diphosphaten hydrolysieren (HORNE und ERDMANN, 1973; GAUNT-KLOEPFER und ERDMANN, 1975). Dies bedeutet, daß die 5S RNS im GTPase-Zentrum der 50S Untereinheit eine entscheidende Rolle spielt.

1.3. Oligonukleotidbindung an RNS

Wie schon im vorigen Abschnitt erwähnt tritt wahrscheinlich die 5S RNS mit der tRNS durch Basenpaarung in Wechselwirkung. Um solche Wechselwirkungsbereiche sowohl in der tRNS als auch bei der 5S RNS zu lokalisieren, eignet sich die Methode der komplementären Oligonukleotidbindung sehr gut. Bei dieser Methode bestimmt man die Assoziationskonstanten von komplementären Trinukleosiddiphosphaten (Trinukleotide) und von Tetranukleosidtriphosphaten (Tetramere). Zunächst wurde diese Methode für die 5S RNS aus E.coli Ribosomen und das Anticodon von $\text{tRNS}_F^{\text{Met}}$ aus E.coli angewendet (LEWIS und DOTY, 1970; UHLENBECK et al., 1970). Später ist dann die ganze tRNS^{Tyr} aus E.coli (UHLENBECK, 1972) und die tRNS^{Phe} aus Hefe (PONGS et al., 1973) mit dieser Methode vermessen worden. Die $\text{tRNS}_F^{\text{Met}}$ aus E.coli und die tRNS^{Tyr} aus E.coli unterscheiden sich in ihren Anticodons: Während das zum 3'-Ende benachbarte Nukleotid des Anticodons bei der tRNS^{Tyr} mit dem entsprechenden Tetramer zugänglich ist, ist dieses bei der $\text{tRNS}_F^{\text{Met}}$ nicht möglich. Dagegen sind die Anticodonbereiche von tRNS^{Tyr} aus E.coli und tRNS^{Phe} aus Hefe in ihrer asymmetrischen Struktur sehr ähnlich: Das zur 3'-Seite

dem Anticodon benachbarte Nukleotid ist mit einem entsprechend überlappendem Tetramer zugänglich.

Für eine Bindung mit komplementären Tri- bzw. Tetranukleotiden ist nicht nur ein Einzelstranbereich notwendig, sondern dieser Bereich muß optimal für eine Basenpaarung ausgerichtet sein. Aus dem Verhalten der Tri- und Tetranukleotide gegenüber kleineren RNS-Molekülen bekannter Primärstruktur lassen sich Aussagen über die Sekundärstruktur und der Basenstapelung (Wechselwirkung benachbarter Basen desselben Stranges) herleiten.

1.4. Aufgabenstellung

In dieser Arbeit soll die Struktur der 5S RNS E.coli mit enzymatisch dargestellten komplementären Tri- und Tetranukleotiden untersucht werden. Mit dieser Methode sollen die für eine Basenpaarung optimal ausgerichteten Bereiche der E.coli 5S RNS ermittelt werden. Durch einen Vergleich mit der Bac.stearothermophilus 5S RNS soll gezeigt werden, inwieweit solche Bereiche in der Evolution konserviert sind. Ferner sollen mögliche Konformationsänderungen, die durch die Anlagerung von Proteinen an die 5S RNS, sowohl von E.coli als auch Bac.stearothermophilus, lokalisiert und charakterisiert werden.

Da die 5S RNS-Protein-Komplexe sowohl ATP als auch GTP zu den entsprechenden Diphosphaten hydrolysieren können, soll der Einfluß dieser Aktivitäten auf die RNS-Struktur untersucht werden.

Durch 50S Rekonstitutionsversuche konnte schon gezeigt werden, daß die pro- und eukaryontischen 5S RNS zwei ganz verschiedenen Klassen angehören. Daher soll eine mögliche Bedeutung der in der großen Untereinheit von 60S Ribosomen vorkommenden 5,8S RNS untersucht werden. Dies soll durch einen Hybridisierungsversucht, der zeigen soll, ob die 5,8S RNS aus Hefe 50S Proteine von E.coli zu binden vermag, entschieden werden.

2. Methoden und Material

2.1. Polynukleotid-Phosphorylase

2.1.1. Aufarbeitung der Polynukleotid-Phosphorylase

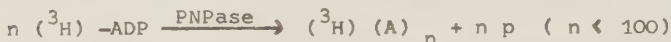
(Polyribonukleotid-orthophosphat-nucleotidyl transferase
E.C.2.7.7.8) (SCHETTERS et al., 1972)

12 g Micrococcus luteus (gefriergetrocknet) werden in 240 ml Enzym-Puffer (0,05M Tris HCl-Puffer (pH 8.0), 5×10^{-3} M $MgCl_2$, $0,5 \times 10^{-3}$ M EDTA und 10^{-3} M β -Mercapto-äthanol) suspendiert und auf 37°C erwärmt. Nach Zusatz von 250 mg Lysozym und 10,6 mg DNase I, jeweils in 10 ml Wasser gelöst, wird die Absorption bei 550 nm verfolgt. 15 Min. nach Enzymzugabe ist der enzymatische Zellaufschluß vollständig. Das Lysat wird auf 4°C abgekühlt und zentrifugiert (Sorvall, 30 Min., 15 000 g, 4°C). Der Überstand wird in 50 ml Fraktionen bei -20°C aufbewahrt. Jeweils 50 ml zentrifugiertes Lysat wird auf eine Sepharose 4B-Säule (5 x 85 cm) aufgetragen und mit Enzym-Puffer eluiert (Fraktion = 10 ml). Nach einem Enzymtest auf PNPase im Bereich von Fraktion 50-90 wird entschieden, welche der Fraktionen gesammelt werden. Die gesammelten Fraktionen von 5 Sepharose 4B-Säulen werden mit Kochsalz auf 0.25 M eingestellt und auf eine DEAE-Sephadex-A50-Säule (6 x 40 cm) aufgetragen.

Die Säule wird mit 500 ml Enzympuffer, der zusätzlich 0.25 M NaCl enthält, nachgewaschen und anschließend mit einem Kochsalz-Gradienten von 0.25-0.55 M in Enzympuffer eluiert (1 Fraktion $\hat{=}$ 19 ml). Die Enzymaktivität liegt reproduzierbar im Bereich von Fraktion 45 - 65. Die Fraktionen, die die Enzymaktivität enthalten, werden durch Ultrafiltration (Zelle Amicon Model 202, Filter: XM50 ϕ 62 mm) angereichert.

2.1.2. Enzymtest

Zu 25 μ l eines 0.14 M Tris-HCl-Puffers (pH 9.2) mit 0.01 M $MgCl_2$, 0.4×10^{-3} EDTA und 0.05 M (3H) -ADP (10mCi/Mol) pipettiert man 2 - 20 μ l Enzymlösung und vermischt sie. Durch Homopolymerisation von (3H -ADP) mit Polynucleotid-Phosphorylase entsteht 3H -markierte Polyadenylsäure:



Nach 30 Min. wird die Reaktion durch 2 Min. Erhitzen auf 90°C und Abkühlung auf 0°C gestoppt und auf Chromatographie-Papier (Whatman 3 MM) und im Fließmittel 1M Ammoniumacetat (pH 7.2): Äthanol = 1:1 entwickelt. Poly ((3H) - A) bleibt am Start des Chromatogramms liegen. Der Fleck wird ausgeschnitten und in Szintillationsgläschen mit je 5 ml Szintillationsflüssigkeit (2.8 g PPO und 0.9 g POPOP/ 1 l Toluol) versehen. Die Radioaktivität wird im Szintillationszähler gemessen. Eine Einheit Enzym entspricht der Menge, die in der Lage ist, 1 μ Mol AMP/Std. zu polymerisieren.

2.2. Synthese von Oligonukleotiden (THACH, 1966)

2.2.1. Synthese von Tripletts

Die Synthese von 3H -markierten Trinukleosiddiphosphaten geschieht mittels eines Dinukleosidmonophosphat-Primers (definierte Sequenz) und den entsprechenden Nukleosiddiphosphaten. Zur Synthese benötigt man die Polynukleotid-Phosphorylase und ganz bestimmte Salzbedingungen, damit keine Polynukleotide entstehen. Das Inkubationsgemisch hat folgende Zusammensetzung:

Vol.	Endkonz.	Substanzen
10 µl	(0.05 µ M)	(³ H) NDP 8 Ci mMol
1-3 µl	(0.28 mM)	NDP 14 mMolar
50 µl	(0.9 mM)	XpY 1.8 mMolar
10 µl	(0.4 M)	4 M NaCl
5 µl	(50 mM)	1 M MgCl ₂
2 µl		PNPase (3 - 10 mg/ml)
19-21 µl	(30 mM Tris) (0.08 mM EDTA)	150 mM Tris, 0.4 mM EDTA, pH 9

Reaktionsvolumen: 100 µl

Das ³H-markierte Nukleosiddiphosphat befindet sich in einer 50 % Äthanol-Lösung, daher wird vor Zugabe der anderen Substanzen der Äthanol unter Vakuum abdestilliert. Wenn möglich, wird entweder 0.1 mg/ml pankreatische RNase oder T1 Ribonuklease hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wird 5-12 Std. bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird gestoppt, indem die Probe 2 Min. auf 90°C erhitzt wird. Ist der Ansatz abgekühlt, wird 0.1 mg/ml alkalische Phosphatase hinzugegeben und 3 Std. bei 37°C inkubiert, um nicht umgesetzte Nukleosiddiphosphate zu hydrolysieren. Die Reaktionsprodukte werden auf einer absteigenden Papierchromatographie aufgetrennt. Um die RF-Werte zu bestimmen, wird Whatman 3MM Papier im folgenden Fließmittel benutzt.

I : 50 : 50 Ammoniumacetat/Äthanol
 II : 40 : 60 " "

Für purinreiche Triplets wird Fließmittel I oder II benutzt, für pyrimidinreiche I. Das Entwickeln der Chromatogramme dauert 12 Std. Nach dem Trocknen der Chromatogramme werden einmal die Reaktionsprodukte unter durchscheinendem UV-Licht mit Bleistift markiert. Der Primer und das Nukleosid absorbieren stark im UV, während das Triplett nur bei guten Ausbeuten im UV zu sehen ist. Zur Identifikation wird das Chromatogramm auf einem Dünnschichtscanner

(Berthold + Frieeseke) bei 30 cm/Std. Vorschub, 30 Imp./sec. Empfindlichkeit, vermessen. Eine andere Methode zur Identifikation ist, einen 5 mm breiten Streifen vom Start bis zur Front ausschneiden und in jeweilige 1 cm Abstände zu zerschneiden. Die Papierstückchen werden dann in Szintillationsgläschen mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (2.8 g PPO, 0.9 g POPOP/1 l Toluol) gegeben und gezählt. Aus den RF-Werten läßt sich dann das Triplet identifizieren und ausschneiden. Um das Ammoniumacetat auszuwaschen, wird das Papier 12 Std. in Äthanol gewaschen, anschließend mit Äther getrocknet. Das Triplet wird dann mit Wasser aus dem Papier eluiert (Volumen $\approx$ 100 μ l) und anschließend bei -30°C aufbewahrt. Die Haltbarkeit des Trinukleotids beträgt 3 - 5 Monate.

2.2.2. Synthese von Tetrameren

Zur Synthese von Tetrameren benötigt man kalte Triplets in genügender Menge. Zur Darstellung der kalten Triplets benutzt man den 10fachen Ansatz der unter Abschnitt 2.2.1. beschrieben wurde.

Der Reaktionsansatz besteht aus folgenden Substanzen:

10 μ l	(0.05 μ M)	(^3H) NDP	18 Ci/mmol
1-3 μ l	(0.28 mM)	NDP	14 mM
50 μ l	(1 mM)	XpYpZ	2 mM
10 μ l	(0.4 M)	4 M NaCl	
5 μ l	(0.05 M)	1 M MgCl_2	
1-3 μ l	(1 - 3 μ g)	PNPase	(3-10 mg/ml)
	(30mM)	150mM Tris HCl	} $\rightarrow$ pH 9.3
18-21 μ l	(0.08mM)	0.4mM EDTA	

Reaktionsvol.: 100 μ l

Die Inkubationszeit beträgt 1 - 3 Std. und die Temperatur 37°C . Die Isolierung der Tetrameren geschieht genau so wie es für die Triplets beschrieben wurde (Abschnitt 2.2.1.).

2.2.3. Sekundäranalyse

Die eluierten Tripletts bzw. Tetramere werden durch entsprechende RNasen-Behandlung, 37°C, 30 Min. Endkonzentration 0.1 mg/ml, inkubiert. Die Reaktionsprodukte werden auf Cellulose-Dünnschichtplatten mit Fluoreszenzidikator (DC-Platte CE-F, Riedel de Haen, Seelze) in aufsteigendem Fließmittel I oder II für 2 Std. entwickelt. Die Reaktionsprodukte werden unter aufscheinendem kurzwelligem UV-Licht identifiziert und mit Filzschreiber markiert. Die Radioaktivität der einzelnen Flecke wird mit einem Dünnschicht-Scanner bei 0,5 cm Spaltlänge lokalisiert. Das Auftragen der Proben geschieht mit fein ausgezogenen Glaskapillaren, so daß der Durchmesser des Flecks weniger als 5 mm beträgt. So können auf einer Dünnschichtplatte 5 Proben aufgetragen werden.

2.3. Gleichgewichtsdialyse

2.3.1. Dialysekammern

Die Probenkammern sind kleine zylindrische Aushöhlungen mit den Abmessungen (1.8 mm x 6 mm), die sich an der Oberfläche von Plexiglasquadern befinden. Die Abmessungen dieser Plexiglasquader betragen (1.8 x 1.8 x 0.8 cm). Die Probenkammern sind durch zwei Bohrungen von 0.2 mm Durchmesser, die in einem rechten Winkel stehen, mit einer Spritze zu erreichen. Die eine Öffnung dient zum Ausgleich des Luftdruckes beim Be- bzw. Entladen. Zwei solcher Kammern werden durch eine dazwischengelegte Dialysemembran voneinander getrennt. Die beiden Kammern werden durch eine U-förmige Messinghalterung, die an einem Schenkel eine Schraube besitzt, zusammengepreßt. Beim Reinigen der Kammern muß eine Kontamination mit RNasen verhindert wer-

den. Während der Dialyse werden die Öffnungen mit selbstklebenden Papieretiketten verschlossen. Die Dialysemembranen werden vor Benutzung 1 Std. bei 127°C sterilisiert.

2.3.2. Ermittlung der Bindungskonstanten (PONGS et a., 1973)

In einer Kammer befindet sich das Makromolekül (5S RNS oder 5S RNS-Protein-Komplex) während die radioaktiven Oligonukleotide zwischen beiden Kammern diffundieren können. Die Gleichgewichtdialyse wird bei 0°C für 3 - 4 Tage durchgeführt. Nachdem die Dialyse beendet ist, entnimmt man mit einer Terumospritze aus beiden Kammern 30 µl und trägt sie auf ein Filterplättchen auf, das nach 20minütigem Trocknen unter einer Infrarotlampe in ein Szintillationsgläschen gegeben wird. In jedes Gläschen werden 5 ml Szintillationsflüssigkeit (2.8 g PPO, 0.9 g POPOP/ 1 l Toluol) gegeben und im Nuklear Chicago Szintillationszähler für 20 Min. gezählt. Die Assoziationskonstante läßt sich nach folgender Gleichung berechnen:

$$K = \frac{(R - 1)}{C}$$

R: ist das Verhältnis zwischen der Radioaktivität in der Kammer mit dem Makromolekül und der Radioaktivität der anderen Kammer.

C: Konzentration der 5S RNS bzw. 5S RNS-Protein-Komplex.

Die obige Gleichung zur Bestimmung der Bindungskonstanten gilt nur für sehr kleine Oligonukleotidkonzentrationen gegenüber der der Makromoleküle (MOORE, 1972).

Die Bindungskonstante K hat die Benennung 1/Mol.

2.4. Darstellung der 50S Ribosomen aus E. coli und Bac. stearothermophilus

Die bakteriellen Ribosomen werden wie beschrieben (WREDE und ERDMANN, 1973) isoliert. Die 70S Ribosomen werden im TMA II (10mM Tris HCl pH 7.4, 30mM NH_4Cl , 0.3mM MgCl_2 , 6mM Mercaptoäthanol) aufgenommen und in ihren Untereinheiten dissoziiert. Danach werden die 30S und 50S Untereinheiten durch Zonalzentrifugation von einander getrennt. In einem Zonalrotor (B XV Ti) können 8000 A_{260} (500 mg) 70S Ribosomen in ihre Untereinheiten aufgetrennt werden. Die Fraktionen, die die 50S Untereinheiten enthalten, werden gesammelt und auf 10mM MgCl_2 gebracht. Dann wird langsam bei 0°C Polyäthylenglykol (MG 6000) hinzugegeben, bis die Konzentration 10 % beträgt. Nach 1 Std. werden die ausgefallenen 50S Untereinheiten durch Zentrifugation konzentriert (36 300 x g, 30 Min. 4°C). Die 50S Ribosomen werden in TMA I (10mM Tris HCl pH 7.4, 30mM NH_4Cl , 10mM MgCl_2 , 6mM β -Mercaptoäthanol) so konzentriert wie möglich aufgenommen und noch einmal abzentrifugiert (36 300 x g, 10 Min.) um größere PEG-Partikel und ungelöste Ribosomen zu entfernen. Dann wird die Absorption der Untereinheiten bei 260nm gemessen und die Untereinheiten bei -80°C gelagert.

2.5. Isolierung der 5S RNS und Gewinnung der 5S RNS-Protein Komplexe

2.5.1. Isolierung der 5S RNS aus E. coli und Bac. stearothermophilus (ERDMANN et al., 1971a)

Die 5S RNS aus E.coli und Bac.stearothermophilus wird aus 70S oder 50S Ribosomen isoliert. 125 mg 70S Ribosomen in TMA I (10mM Tris HCl pH 7.4, 30mM NH_4Cl , 10mM MgCl_2 , 6mM β -Mercaptoäthanol), werden mit diesem Puffer so verdünnt,

daß die Ribosomenkonzentration nicht 10 mg/ml übersteigt. Um die RNasen zu inhibieren, wird zu dieser Ribosomenlösung Bentonit hinzugegeben, so daß die Endkonzentration 0.2 % beträgt. Ferner wird die Lösung mit Natriumdodecylsulfat (SDS) auf 0,5 % und EDTA (Titriplex) auf 5mM eingestellt. SDS soll die Protein-RNS-Wechselwirkungen aufheben. Diese Ribosomenlösung wird unter Rühren für 15 Min. bei 0°C inkubiert. Dann wird dazu gleiches Volumen destilliertes Phenol, gesättigt mit 0.25 M Kalziumphosphatpuffer pH 7, 0°C, hinzugegeben und 4 Min. kräftig auf Eis geschüttelt. Diese Suspension wird durch Zentrifugation, bei 36 300 x g für 15 Min. in eine wäßrige Phase und eine Phenolphase aufgetrennt. Die trübe-wäßrige Phase wird solange mit Phenol extrahiert, bis sie klar ist. Die RNS in der wäßrigen Phase wird durch Hinzugabe von Natriumacetat pH 5.5 (10mM) und doppelter Menge absoluten Äthanol bei -20°C präzipitiert. Nach 1 Std. wird das Präzipitat durch Zentrifugation bei 36 300 x g für 15 Min. konzentriert und in Aqua bidest aufgenommen. Diese totale RNS wird nach Molekulargewicht auf einer Sephadex G-100 Säule (3.2 x 170 cm) aufgetrennt. Als Elutionsmittel dient 50mM KCl, 1 % Methanol. Die Fraktionsgröße beträgt 12 ml. Die Absorption wird bei 260 nm gemessen und die 5S RNS enthaltenen Proben gesammelt. Nach Zugabe von Natriumacetat (pH 5.5, 10mM) und 2 Volumen Äthanol wird die 5S RNS für 12 Std. bei -20°C präzipitiert und durch Zentrifugation (36 300 x g, 15 Min.) konzentriert wie möglich in Aqua bidest gelöst. Jede 5S RNS Präparation wurde auf ihre Reinheit durch Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht.

2.5.2. Gewinnung des 5S RNS-Proteinkomplexes aus E. coli (HORNE und ERDMANN, 1972)

E.coli 50S Untereinheiten werden in 4 M Harnstoff und 2 M Lithiumchlorid für 12 Std. bei 0°C dissoziiert. Danach wird die Probe bei 36 300 x g für 8 Min. bei 0°C

durch Zentrifugation vollständig in ein RNS-Sediment und einen Proteinüberstand getrennt. Die Proteine (UTP 50) werden vorsichtig abpipettiert und das $A_{260} : A_{280}$ Verhältnis und das Volumen bestimmt. Geht man von 1000 A_{260} Einheiten 50S Ribosomen aus, so entsprechen die Proteine 1000 A_{260} Äquivalenz -Einheiten (A E). Dieser Proteinüberstand ist frei von jeglicher RNS. Die Proteine werden gegen 2 Liter TR-Puffer (30mM Tris-HCl pH 7.4, 20mM $MgCl_2$, 320mM KCl, 6mM Mercaptoäthanol), der dreimal nach jeweils 3 Std. gewechselt wird, bei $0^{\circ}C$ dialysiert. Nach dieser Dialyse fallen Proteine aus, die bei 36 300 x g, für 15 Min. abzentrifugiert werden. Vom Überstand wird wieder das $A_{260} : A_{280}$ Verhältnis und das Volumen bestimmt. Die in Aqua bidest gelöste E.coli 5S RNS wird auf 30mM Tris, 20mM $MgCl_2$ gebracht und 30 Min. bei $60^{\circ}C$ inkubiert und langsam abgekühlt; dann wird die 5S RNS Lösung auf 320mM KCl gebracht. Zu den 1000 A_{260} Protein-Äquivalenzen werden 2.4 % 5S RNS, also 24 A_{260} (2 mg), hinzugegeben, vermischt und über 12 Std. bei $0^{\circ}C$ inkubiert. Nach dieser Inkubation fallen wiederum Proteine aus, die durch Zentrifugation entfernt werden.

Um den 5S RNS-Proteinkomplex von den ungebundenen Proteinen zu trennen, wird die Probe auf einem Sucrose-Gradienten in TR (30mM Tris-HCl pH 7.4, 20mM $MgCl_2$, 320mM KCl, 6mM Mercaptoäthanol) gegeben. Sechs SW27 Becher werden jeweils mit 14ml 50 % Sucrose in TR-Puffer gefüllt. Darüber werden 2ml 20 % Sucrose in TR gegeben. Auf diese Sucrose-Kissen wird ein linearer 20ml 5 - 15 % Sucrose-Gradient in TR aufgetragen. Die Abtrennung erfolgt durch Zentrifugation bei 25 000 Upm, für 60 Std. bei $4^{\circ}C$. Danach wird der Gradient von unten angestochen und in Gläschen gesammelt (Fraktionsgröße 0.9 ml) und die Absorption bei 260 nm und 280 nm im Zeiss PQM II Photometer gemessen. Die Fraktion, die den 5S RNS-Protein-Komplex enthalten, werden zusammengegeben und gegen 2 Liter TR-Puffer, der 3 mal nach jeweils 3 Std. gewechselt wird, dialysiert. Dann wird die Probe in Aquacide II bei $0^{\circ}C$ konzentriert,

A₂₆₀ und A₂₈₀ gemessen und in 1 ml Portionen bei -80°C gelagert.

Um die Proteinzusammensetzung der 5S RNS-Protein-Komplexe zu bestimmen, werden die Komplexe zunächst gegen TMAI (10mM Tris-HCl pH 7,4; 30mM NH₄Cl; 10mM MgCl₂; 6mM β -Mercaptoäthanol) dialysiert, auf 0,1 M MgCl₂ gebracht und eine Stunde mit 66 % Eisessig extrahiert. Nach der Extraktion wird die ausgefallene 5S RNS durch Zentrifugation (35 000 g, 15 Min., 4 C) entfernt und der Überstand zunächst 2 Stunden gegen 20 % Essigsäure und dann für 12 Stunden gegen 5 % Essigsäure dialysiert. Die extrahierten Proteine werden anschließend lyophilisiert und sind somit für die 2-D Elektrophorese präpariert.

2.5.3. Gewinnung des 5S RNS-Proteinkomplexes aus Bac. stearothermophilus (HORNE und ERDMANN, 1972)

Die unter 2.4.2. beschriebene UTP-Fraktion enthält bei Bac.stearothermophilus 70 % der 5S RNS. Daher wird die UTP-Fraktion unter denselben Bedingungen wie unter 2.4.2! angegeben, gegen TR dialysiert, die ausgefallenen Proteine durch Zentrifugation entfernt und der Überstand auf einen Sucrose-Gradienten gegeben. Die Isolierung des Bac.stearothermophilus 5S RNS-Proteinkomplexes geschieht genau so wie unter 2.4.2. für E.coli angegeben. Der Bac.stearothermophilus 5S RNS-Proteinkomplex wird als nativer Komplex bezeichnet, da er bereits von Anfang an in der UTP50-Fraktion enthalten ist.

2.5.4. Isolierung der 5.8S RNS aus Saccharomyces cerevisiae (WREDE und ERDMANN, in Vorbereitung)

Die 60S ribosomale Untereinheit aus Hefe enthält zwei kleine RNS-Spezies, eine 5S RNS und eine 5.8S RNS. Die 5.8S RNS ist durch Basenpaarung mit der 28S ribosomalen

RNS verbunden. 2000 A₂₆₀ 80S Ribosomen werden mit Phenol extrahiert (siehe 2.4.1.) und nach einer Alkoholfällung konzentriert. Das Präzipitat wird in 6M Harnstoff gelöst und 5 Min. auf 60°C erhitzt und in 0°C Eiswasser abgekühlt. Die RNS wird nach Molekulargewicht auf einer Sephadex G-100 Säule (3.2 x 175 cm) aufgetrennt. (Elutionsmittel: 0.05M KCl, 1 % Methanol) und die 5.8S RNS enthaltenen Proben gesammelt und durch eine Alkoholfällung (66 % Äthanol, 12 Std., -20°C) mit anschließender Zentrifugation konzentriert. Die 5.8S RNS wird sowohl durch das Säulen-Chromatogramm als auch durch die eindimensionale Polyacrylamidgel-Elektrophorese identifiziert.

2.6. Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)

2.6.1. Eindimensionale RNS-PAGE (PEACOCK und DINGMANN, 1967)

Für eine gute Trennung der 5.8S RNS, 5S RNS und tRNS wird die 3,1 % und 10 % kombinierte Gelelektrophorese benutzt. Diese Gele bestehen aus einem 4,5 cm langen 3.1 % Obergel und einem 4,5 cm langen 10 % Untergel.

Lösungen :

10 % Gel Lösung A (50 ml)

2.5 ml 60 % Sucrose

5.0 g Acrylamid

0.1 g N, N'-Methylenbisacrylamid

5 ml 10 x TEB (890mM Tris, 25 mM Na₂-EDTA,
890 mM Borsäure)

42.5 ml Aqua bidest

Für 6 Gele mit einer Länge von 9 cm gebraucht man:

10 ml von Lösung A (entgast) + 5 ul TEMED (N, N, N',N'-Tetramethyläthylendiamin) + 200 µl 1.6 % Ammoniumperoxi-

disulfat. Nachdem das Ammoniumperoxidisulfat in der Lösung ist, werden die Gele sofort auf eine Höhe von 4.5 cm gegossen und mit einem Tropfen TEB (89mM Tris, 2.5mM Na₂ EDTA, 89 mM Borsäure, pH 7.8) überschichtet. Die Polymerisation geschieht unter Luftabschluß. Ist das 10 % Gel polymerisiert, so wird der überschichtete TEB Puffer abpipettiert und das 3.1 % Gel darüber gegossen. Vorher sind die entsprechenden Katalysatoren in den gleichen Mengen wie bei der 10 % Gellösung hinzugegeben.

3.1 % Gellösung B (50 ml)
2.5 ml 60 % Sucrose
1.55 g Acrylamid
5 ml 10 x TEB (890mM Tris, 25 mM Na₂ EDTA,
890mM Borsäure)

Durchführung der Elektrophorese

Elektrophorese-Puffer: 1 x TEB 89mM Tris,
25mM Na₂ EDTA,
89mM Borsäure
pH 7.8

Vorlauf : 15 Min., 1 mA/Gel
jedoch nicht über 12mA
Hauptlauf: Kathode oben, Anode unten,
2mM/Gel, jedoch nicht über 24mA.
Pro Gel wird 0.1 A₂₆₀ 5.8S, 5S
oder tRNS aufgetragen.

Die Proben haben ein Volumen bis zu 50 µl in 5 % Sucrose. Als Marker dient 0.1 % Bromphenolblau in TEB und 15 % Sucrose, von welchem 5 µl aufgetragen werden. Die Gelelektrophorese wird beendet, wenn der Bromphenolblau-Marker am unteren Ende angelangt ist. Die Gele werden in 0.1 % Toluidinblau und 1 % Essigsäure 45 Min. gefärbt und in 5 Liter 5 % Essigsäure in 3 Stunden entfärbt. Danach werden die Gele in 1 % Essigsäure aufgehoben und photographiert.

2.6.2. Zweidimensionale Polyacrylamidgel-Elektrophorese (KALTSCHMIDT und WITTMANN, 1970)

Zum Auftrennen und Identifizieren der ribosomalen Proteine dient die zweidimensionale Polyacrylamidgel-Elektrophorese.

2 mg 70S Proteine werden pro Gel aufgetragen. In der ersten Dimension werden die Proteine bei pH 8.6 in einem 8 %-igen Acrylamidgel vornehmlich aufgrund ihrer Nettoladungen getrennt, während in der zweiten Dimension, bei pH 4.6 und 18 %-igem Acrylamid, vorzugsweise die Molekülgröße die Trennung bestimmt. Die fraktionierten Proteine werden auf der Gelplatte mit Amidoschwarz angefärbt (0.5 % Amidoschwarz, 5 % Essigsäure, 5 Minuten). Die Platten werden für wenige Stunden mit fließendem Wasser gespült und dann mit 1 %-iger Essigsäure weiter entfärbt.

2.7. Herkunft der Materialien

RNaseA	Ribonucleat -Pyrimidin-Nucleotid-2`-Transferase E.C. 2.7.7.16 Boehringer Mannheim Kat.Nr. 15 410
T1	Ribonucleat-Guaninenucleotid-2`-Transferase E.C. 2.7.7.26 Boehringer Mannheim Kat.Nr. 15 411
DNaseI	Deoxyribonucleat Oligonucleotid-Hydrolase E.C. 3.1.4.5 Boehringer Mannheim Kat.Nr. 15 469
Lysozym	N-Acetylmuramid Glycan-Hydrolase Boehringer Mannheim Kat.Nr. 15 351

Alle Dinukleosidmonophosphat-Primer waren von Pharmacia Werke, Waldhof, Mannheim

Nukleosiddiphosphate:

ADP	Adenosin -5'-diphosphat Boehringer Mannheim Kat.Nr. 15 691
CDP	Cytosin -5'-diphosphat Boehringer Mannheim Kat.Nr. 15 077
GDP	Guanosin -5'-diphosphat Boehringer Mannheim Kat.Nr. 15 032
UDP	Uridin -5'-phosphat Boehringer Mannheim Kat.Nr. 15 034

Radioaktive Nukleosiddiphosphate von Amersham Buchler,
Amersham

(³ H)-ADP	(2-3H) Adenosin 5'-Diphosphat Ammonium-Salz 18 Ci/mmol TRK 345
(³ H)-CDP	Cytidin -5'-Diphosphat Ammonium-Salz 23 Ci/mmol TRK 338
(³ H)-GDP	Guanosin-8-H3-5'- Diphosphat Ammonium-Salz 5Ci/mmol TRK 335
(³ H)-UDP	Uridin -5-H3-5'-Diphosphat Ammonium-Salz 19,6Ci/mmol TRK 349

Alkalische Phosphatase E.C.3.1.3.1. aus E.coli
Boehringer Mannheim, Kat.Nr.15 429

Benutzte Geräte:

Zentrifugen: Sorvall Superspeed RC2B, Spinco L3 50B

Szintillationszähler: Nuclear Chicago

Dünnschicht Scanner Berthold & Frieseke

Photometer Zeiss PMQII

3. Ergebnisse

3.1. Synthese der Tri- und Tetranukleotide

3.1.1. Charakterisierung der Polynucleotid-Phosphorylase

Die Polynucleotid-Phosphorylase (Polyribonucleotid-Orthophosphat-Nucleotidyl-Transferase (E.C. 2.7.7.8.)) hat ein Molekulargewicht von 220 000 Dalton und besteht aus vier Untereinheiten mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 59 000 Dalton. Dieses Enzym katalysiert in Gegenwart eines Dinukleosidmonophosphat-Primers und Nukleosiddiphosphat unter Freisetzung von Orthophosphat RNS-Oligomere.



Das Enzym kann die Reaktion in beide Richtungen katalysieren.

Das Enzym konnte durch die zwei Säulenschritte 20-30 fach aufgereinigt werden. Die spezifische Aktivität betrug zwischen 250-300 Einheiten pro mg Protein. Diese Aktivität stimmt mit den in der Literatur genannten Werten gut überein (SCHETTERS et al. 1972).

3.1.2. Synthese der Trinukleotide

Die Synthese der Trinukleotide geschah wie unter 2.2.1. angegeben. Trinukleotide, die nur am 3'-Ende ein Guanin besitzen, wurden unter Zugabe von RNase T1 (Ribonucleat Guaninenucleotid -2'-Transferase cyclizing E.C. 2.7.7.26) synthetisiert, da dadurch die Ausbeute bis zu 80 % erreicht wurde. Umgekehrt sind die ersten beiden Nukleotide Purine und das 3'-terminale Nukleosid ein Pyrimidin, dann wurde bei der Synthese RNaseA (Ribonucleat Pyrimidin - Nucleotido-2'-Transferase (cyclizing) E.C. 2.7.7.16) hinzugegeben. Die Synthese von reinen Pyrimidintripletts bereitete Schwierigkeiten, die durch Erhöhung der Primerkonzentration (5fach) und der Natriumchloridkonzentration auf 0.8M beseitigt werden konnten. In der Tab. 1 sind die R_F -Werte aller synthetisierten Trinukleotide angegeben.

Tab. 1

R_F-Werte der synthetisierten Tri- und Tetranukleotide
in verschiedenen Fließmitteln

I 50 : 50 NH₄Ac/Äthanol
II 40 : 60 NH₄Ac/Äthanol

Trinukl.	R _F	Fließm.	Trinukl.	R _F	Fließm.
AAA	0,28	I	CGA	0,36	I
AAC	0,32	I	CGC	0,43	I
AAU	0,38	I	CGG	0,38	I
			CGU	0,39	I
ACA	0,36	I			
ACC	0,46	II	CUA	0,46	II
ACG	0,35	I	CUC	0,53	II
ACU	0,42	I	CUG	0,52	II
			CUU	0,57	II
AGA	0,23	I			
AGC	0,36	I	GAA	0,30	I
AGG	0,28	I	GAC	0,41	I
AGU	0,36	I	GAG	0,25	I
			GAU	0,40	I
AUC	0,40	I			
AUG	0,35	I	GCA	0,47	I
AUU	0,46	II	GCC	0,40	II
			GCG	0,30	I
CAA	0,42	I	GCU	0,48	I
CAC	0,45	I			
CAG	0,35	I	GGA	0,26	I
CAU	0,47	I	GGC	0,33	I
			GGU	0,35	I
CCA	0,47	II			
CCC	0,48	II	GUA	0,38	I
CCG	0,40	I	GUC	0,43	II
CCU	0,48	II	GUG	0,38	I
			GUU	0,46	II

Trinukl.	Rf-Wert	Fließm.
UAA	0,41	I
UAC	0,38	I
UAG	0,31	I
UAU	0,48	I
UCA	0,38	I
UCC	0,50	I
UCG	0,37	I
UCU	0,54	I
UGC	0,44	I
UGG	0,37	I
UGU	0,54	I
UUA	0,50	I
UUC	0,60	II
UUU	0,57	II

Tetram.	Rf-Wert	Fließm.
ACCU	0,30	I
ACGG	0,06	I
AGAG	0,16	I
AGGU	0,19	I
AUCG	0,25	I
AUGG	0,21	I
CAGG	0,24	I
GACC	0,15	I
GCGC	0,10	I
GGUG	0,10	I
UAGC	0,24	I
UAGG	0,14	I
UCGG	0,27	I
UUCG	0,30	I

Die Ausbeute der genannten Trinukleotide (Tripletts) beträgt 10-40 % bezogen auf die Primerkonzentration, wobei die in Gegenwart der entsprechenden RNasen synthetisierten Tripletts noch höhere Ausbeuten erreichten. Wenn CpG zunächst als Primer benutzt wurde, konnte keine Triplettsynthese erreicht werden, obgleich die Primerkonzentration und die NaCl-Konzentration erhöht wurden. Es wurde festgestellt, daß das CpG wie folgt aufgereinigt werden mußte:

8 mg CpG (lyophilisiert) in 2 ml Aqua bidest gelöst, wurde auf einem 27 cm breiten Whatman 3MM Papierbogen in einem 0,5 cm breiten Streifen aufgetragen. Das Chromatogramm wurde im Fließmittel 50 : 50 (1M NH_4Ac /Äthanol) 12 Std. entwickelt. Bei durchscheinendem UV - Licht konnten zwei unterschiedlich intensive Banden identifiziert werden. Die stark absorbierende Bande hatte einen $R_F = 0,54$, während die sehr schwach absorbierende Bande einen $R_F = 0,6$ aufwies. Die Substanz mit dem $R_F = 0,54$ wurde mit Wasser eluiert, bis zur Trockenheit eingengt und in 2 ml Wasser aufgenommen. Diese trübe Lösung wurde über eine Sephadex G-25 Säule (0,7 x 5,5 cm) aufgereinigt. Es wurden 76 A_{260} reines CpG isoliert. Die Substanz verhielt sich im Absorptionsspektrum von 200 - 300 nm wie CpG (Abb. 1).

Die Tripletts können einmal durch ihren R_F -Wert charakterisiert werden, indem die entsprechenden Kontrollen mit aufgetragen werden, zum anderen kann durch eine Sekundäranalyse die Sequenz des Tripletts kontrolliert werden. So traten bei der Synthese von ApCpC auf dem Chromatogramm zwei Flecken mit erhöhter Radioaktivität auf, mit $R_F1 = 0,4$ und $R_F2 = 0,51$. Werden 5000 cpm (ca. 10 μl) der entsprechenden Probe mit 5 μl RNase A (spaltet $\text{ApCpC} \rightarrow \text{ApCp} + \text{C}$) 1 Std. bei 37°C inkubiert, so erwartet man nach Entwicklung in 50 : 50 (NH_4Ac /Äthanol) auf einer Cellulose-Dünnschichtplatte ein Maximum, das

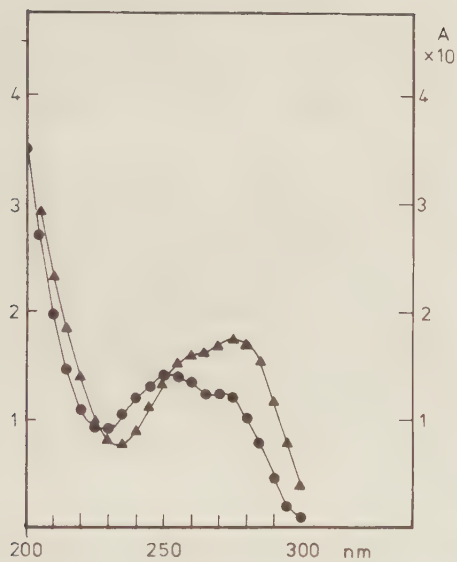


Abb. 1 UV-Absorptionsspektrum im Bereich 200-300 nm
von CpG

▲ — ▲ pH 7

● — ● pH 1

dem ^3H -Cytosin zugeordnet werden kann. Dies war bei der Probe, die auf dem Chromatogramm mit $R_F 1$ bezeichnet war, auch der Fall. Die andere Probe, die auf dem Chromatogramm mit $R_F 2$ bezeichnet war, besitzt zwei Maxima, die auf der Cellulose-Dünnschicht-platte mit $RF_a = 0,43$ (Cp) und $RF_b = 0,77$ (C) liefen. Hier ist der Fall einer Homopolymerisation des CDP eingetreten, also CpCpC (Abb. 2). Durch Erhöhung der NaCl Konzentration auf 0,8 M kann diese Homopolmerisation verhindert werden. Die Synthese von GpGpG ist aufgrund der starken Aggregation nicht möglich gewesen.

Die NaCl-Konzentration ist wichtig für die Kettenlänge der Polymere. Desto geringer die NaCl-Konzentration ist, desto länger werden die Polymere. Eine NaCl-Konzentration von 0,4 - 0,8 M hat sich als optimal für die Synthese von Tri- und Tetranukleotiden erwiesen. Für die Auftrennung der Reaktionsprodukte auf Whatmann 3MM Chromatographiepapier hat sich für pyrimidinreiche Oligonukleotide 40 : 60 NH_4Ac /Äthanol als gutes Fließmittel erwiesen, während für purinreiche Oligonukleotide 50 : 50 NH_4Ac /Äthanol ausreichend war.

3.1.3. Synthese der Tetramere

Zur Synthese von Tetrameren wurden zwei Wege beschritten:

3.1.3.1. Synthese von kalten Tripletts, die als Primer benutzt wurden,

3.1.3.2. Polymerisation ohne Hinzufügung von RNasen.

3.1.3.1. Wie unter 2.2.2. beschrieben, wurden durch Inkubationszeiten von 2 - 3 Std. die Tetramere synthetisiert. Bei Trinukleosiddiphosphaten als Primer ist die Gefahr, daß durch zu lange Inkubation der Primer durch die PNPase (E.C. 2.7.7.8) phosphoryliert wird.

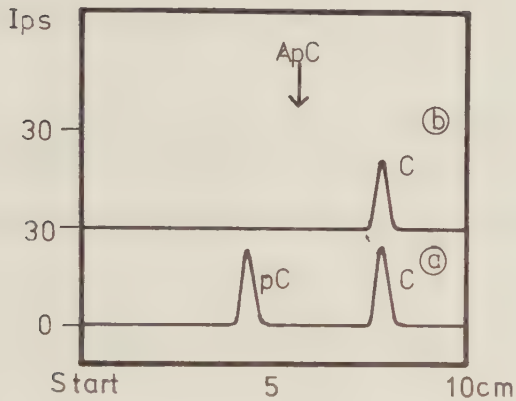


Abb. 2 Sekundäranalyse von ApCpC auf einer Cellulose-
Dünnschichtkarte

a : CpCpC nach RNaseA-Behandlung

b : ApCpC nach RNaseA-Behandlung

Fließmittel: 50 : 50 NH_4AC /Äthanol

3.1.3.2. Oft können Tetramere bei der Synthese von Tripletts isoliert werden, wenn man z.B. keine Ribonuklease T1 bei der Synthese von UpApG hinzugibt. Bei kürzerer Inkubationszeit entsteht dann UpApG und UpApGpG. Bei der Synthese von Homopolymeren, wie ApApA oder CpCpC treten immer die entsprechenden Tetramere auf.

3.2. Charakterisierung der 5S RNS und 5S RNS-Proteinkomplexe aus E.coli und Bac.stearothermophilus

3.2.1. 5S RNS aus E.coli und Bac.stearothermophilus

Die in H₂O gelösten 5S RNS Moleküle aus beiden Organismen werden bei -80°C gelagert. Vor Gebrauch werden die Proben durch Zugabe von Salzen auf TR-Bedingungen (30mM Tris-HCl pH 7.4; 20mM MgCl₂; 320mM KCl; 6mM β-Mercaptoäthanol) gebracht. Um eventuelle denaturierte 5S RNS zu renaturieren, wird die 5S RNS 30 Min. bei 37°C (E.coli) bzw. 60°C (Bac.stearothermophilus) inkubiert und langsam abgekühlt. Die so behandelte RNS zeigte in der RNS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nur eine Bande. Unter diesen Salzbedingungen liegt die 5S RNS in nativer Form vor, da sie auch so in der Rekonstitution eingebaut werden kann (WREDE und ERDMANN, 1973).

3.2.2. 5S RNS - Proteinkomplexe aus E.coli und Bac.stearothermophilus

Zur Darstellung des 5S RNS-Proteinkomplexes hat sich der Saccharose-Gradient gut bewährt. Das Profil eines solchen Gradienten ist in Abb. 3 und 11 a gezeigt.

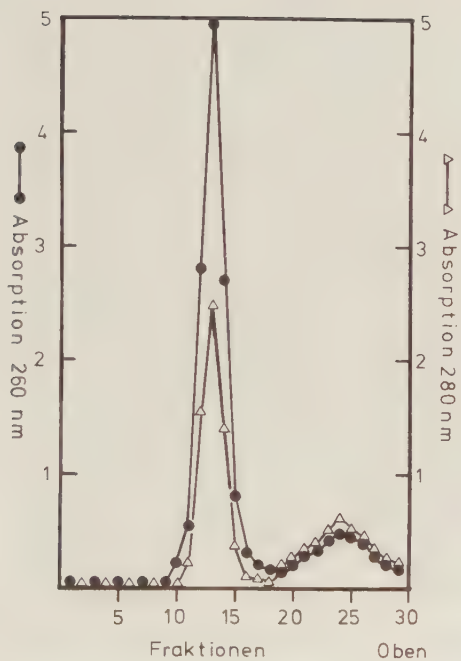


Abb. 3 Gradientenprofil für den 5S RNS-Proteinkomplex aus *Bac. stearothermophilus*

Angaben zum Gradienten siehe Text

Man sieht, daß die freien Proteine nicht in die Saccharose-lösung eindringen, da das spezifische Gewicht geringer als das der Saccharoselösung ist. Der 5S RNS-Proteinkomplex kann in einer Konzentration von 7 - 10 A₂₆₀/ml dargestellt werden. Das Absorptionsverhältnis A₂₆₀ : A₂₈₀ beträgt beim 5S RNS-Proteinkomplex 2 : 1. Die Ausbeute, bezogen auf die Menge eingesetzter 5S RNS bzw. 50S Ribosomen, beträgt in beiden Fällen 57 %. Charakteristisch ist das identische Verhalten der beiden RNS-Proteinkomplexe aus E.coli und Bac.stearothermophilus im Saccharosegradienten (vgl. Abb 3 und 11a). Die RNS-Proteinkomplexe wurden auf ihre GTPase-Aktivität getestet und in der zweidimensionalen Polyacrylamidegel-Elektrophorese untersucht. Der 5S RNS-Proteinkomplex aus E.coli enthält die Proteine E-L5, E-L18 und E-L25 (s. Abb. 4), während der 5S RNS-Protein-Komplex aus Bac.stearothermophilus die Proteine B-L5 und B-L22 enthält. Die hier gefundenen 5S RNS Bindungsproteine stimmen mit den vorher beschriebenen überein (HORNE und ERDMANN, 1972).

Für beide 5S RNS-Protein-Komplexe konnten GTPase-Aktivitäten nachgewiesen werden.

3.3. Bindungsdaten der Tripletts und Tetramere an E.coli 5S RNS und 5S RNS-Proteinkomplex

3.3.1. Bindung an proteinfreier 5S RNS aus E.coli

3.1.1.1. Dialysebedingungen

Die Bindung von enzymatisch dargestellten Trinukleosiddiphosphaten und Tetranukleosidtriphosphaten an der freien 5S RNS werden mit der Gleichgewichtsdialyse untersucht (UHLENBECK, 1972; PONGS et al., 1973). Es werden zur 5S RNS-Sequenz komplementäre Trinukleosiddiphosphate, die am 3'-Ende ein ³H-markiertes Nukleotid enthalten, darge-

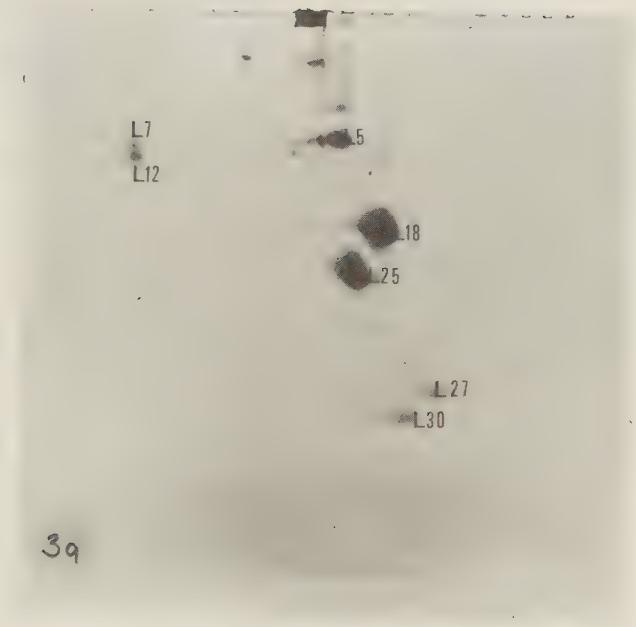


Abb. 4 Zweidimensionale Gel-Elektrophorese von riboso-
malen Proteinen der großen Untereinheit

Rekonstituierter E.coli 5S RNS-Proteinkomplex

stellt. Die Konzentration der Trinukleosiddiphosphate bzw. Tetranukleosidtriphosphate während der Dialyse beträgt $0,04 - 30 \times 10^{-9}$ Molar, die 5S RNS Konzentration $15 - 20 \times 10^{-6}$ Molar. Das Molekulargewicht der 5S RNS beträgt 42000 Daltons. $20 A_{260}$ Einheiten 5S RNS entsprechen 1 mg, also 23×10^{-9} Mol.

Als Dialysepuffer wird der Rekonstitutionspuffer (30mM Tris-HCl pH 7.4; 20mM $MgCl_2$; 320mM KCl; 6mM β -Mercapto-Äthanol) benutzt, um die Bindungsdaten der freien 5S RNS mit denen vom 5S RNS-Protein komplex vergleichen zu können.

Ferner ist anzunehmen, daß unter diesen Bedingungen die 5S RNS eine optimale Struktur einnimmt, weil dieser Puffer die Rekonstitution der 5S RNS-Proteinkomplexe ermöglicht (HORNE und ERDMANN, 1972, WREDE und ERDMANN, 1973). Die Bindungskonstante eines Triplets allein sagt meistens nicht, ob eine Bindung vorliegt, weil man nicht voraussagen kann, wie groß die Bindungskonstante einer bestimmten Trinukleotidsequenz sein muß. Daher nimmt man die Bindung eines entsprechenden Tetramers zu Hilfe und ermittelt, um welchen Faktor die Bindungskonstante des Tetramers größer als die des Trinukleotides ist. Für eine positive Bindung muß die Bindungskonstante des Tetramers mindestens das Fünffache der Summe der Bindungskonstanten der beiden überlappenden Trinukleotide betragen, also

$$K_{WpXpYpZ} = a \times (K_{WpXpY} + K_{XpYpZ})$$

Positive Bindung : $a > 5$

Mittlere Bindung : $5 \geq a \geq 2$

Kleine Bindung : $2 > a > 0$

Für eine positive Bindung, das bedeutet, wenn die vierte Base wirklich durch Basenpaarung zur Erhöhung der Bindungskonstanten beiträgt, muß der a - Wert mindestens gleich fünf sein. Der a - Wert für die positive Bindung leitet sich aus der Kooperativität der Basenpaarung her (SCHWARZ und ENGEL, 1972).

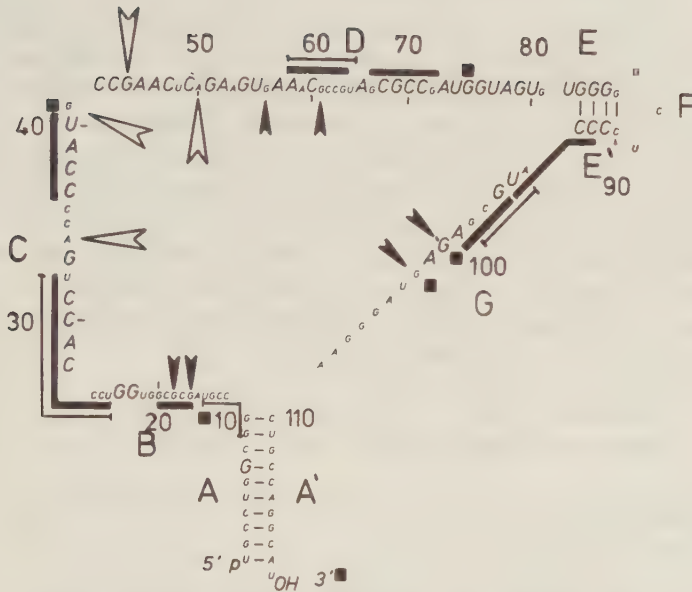


Abb. 5 Oligonukleotidbindungsgebiete an der freien 5S RNS aus *E. coli*

- Bindungsgebiete nach LEWIS und DOTY (1970)
- chemische Modifizierungen nach ERDMANN (1976)
- Enzymatische Spaltungen nach BELLEMARE et al. (1972)
- nach MIRZABEKOV und GRIFFIN (1972)

Die groß geschriebenen Nukleotide sind bei allen prokaryontischen 5S RNS konserviert, während die kleingeschriebenen variabel sind (ERDMANN, 1976).

3.3.1.2. Bindungsdaten von Oligonukleotiden an der proteinfreien E.coli 5S RNS

Die 5S RNS läßt sich in sieben Regionen einteilen, die mit A - G bezeichnet werden (ERDMANN, 1976). Die Bindungsdaten werden einzeln, nach den Regionen geordnet, erläutert (vgl. dazu Tab. 2 und Abb. 5). Die Positionsnummern der 5S RNS werden in Richtung 5'-Ende zum 3'-Ende durchgezählt. Die Werte der Bindungskonstanten leiten sich aus mindestens zwei Messungen ab. In kritischen Fällen wurden bis zu zehn Messungen durchgeführt. Im folgenden werden nur die Sequenzen der Oligonukleotide genannt. Die 5S RNS Antisequenz liest sich umgekehrt und komplementär zur Richtung der Oligonukleotidsequenz, z.B.

Oligonukleotid	5'C-G-A 3'
5S RNS-Antiseque.	3'G-C-U 5'

A -Region Pos.Nr. 1 - 10

A'-Region Pos. Nr.110 - 120

Die A - A'-Region wird in allen bisher publizierten 5S RNS-Modellen als basengepaarte Region dargestellt, weil sich im Durchschnitt 10 Basenpaare für diese Region anbieten (ERDMANN, 1976).

In der A-Region gibt es keinen Bereich, der für Oligonukleotidbindung zugänglich ist. Die beiden Trinukleotide C-A-G und A-G-G, $K_{CAG} = 3300 \text{ M}^{-1}$ $K_{AGG} = 7200 \text{ M}^{-1}$, binden nicht in dieser Region, da das Tetramer C-A-G-G eine Bindungskonstante von $K = 14000 \text{ M}^{-1}$ hat, also $a = 1,3$. In der A'-Region bindet ebenfalls kein Trinukleotid. Die Bindungskonstante von C-C-U mit $K = 1000 \text{ M}^{-1}$ ist für ein doppeltes G-C-Paar am 5'-Ende des Nukleotids zu gering. Das Trinukleotid G-C-C könnte nur in der A bzw. A'-Region binden, allerdings ist die Bindungskonstante $K_{GCC} = 3400 \text{ M}^{-1}$ ziemlich klein.

B-Region Pos. Nr. 11 - 27

In dieser Region bindet das Trinukleotid G-G-A mit $K_{GGA} = 5000 \text{ M}^{-1}$ in Pos. Nr. 25-27. Am 5'-Anfang der B-Region könnten die beiden Trinukleotide A-C-G mit $K_{ACG} = 2000 \text{ M}^{-1}$ und C-G-G mit $K_{CGG} = 6000 \text{ M}^{-1}$ binden, aber die Messung mit dem Tetramer A-C-G-G ergibt $K_{ACGG} = 1000 \text{ M}^{-1}$ und $a < 2$. Das Tetramer G-C-G-C, dessen Antisequenz auf der 5S RNS zwischen Pos. Nr. 16 - 19 liegt, bindet mit einer Konstanten von $K_{GCGC} = 47000 \text{ M}^{-1}$, während die Bindungskonstanten der entsprechenden Trinukleotide $K_{GCG} = 4900 \text{ M}^{-1}$ und $K_{CGC} = 5300 \text{ M}^{-1}$ betragen. Dies bedeutet einen a -Wert von $a = 4,6$, also ein Betrag, der sich an der oberen Grenze der mittleren Bindung befindet. Es ist aber wahrscheinlicher, da in der B-Region die benachbarten Oligonukleotide nicht binden, daß dieses Tetramer in der D-Region zwischen den Pos. Nr. 67 - 70 bindet.

C-Region Pos. Nr. 28 - 41

Am 5'-Ende dieser Region tritt mit der konservierten 5S RNS-Sequenz C-A-C-C das Tetramer G-G-U-G mit einer Assoziationskonstanten von $K_{GGUG} = 18000 \text{ M}^{-1}$ in Wechselwirkung. Der a -Wert, der die Bindung charakterisiert, beträgt 2,6, also eine mittlere Bindung. Das Tetramer A-G-G-U kann mit der 5S RNS in Pos. Nr. 29 - 32 basenpaaren, die Assoziationskonstante beträgt $K_{AGGU} = 26000 \text{ M}^{-1}$ und $a = 2,2$, was eine mittlere Bindung bedeutet. Am 3'-Ende der C-Region befindet sich die 5S RNS-Sequenz C-C-A-U, die komplementär zum Tetramer A-U-G-G ist, welches eine Assoziationskonstante von $K_{AUGG} = 12100 \text{ M}^{-1}$ und einen a -Wert von 2,2 hat. Dieses Tetramer könnte ebenfalls im Übergang von der E'-Region zur G-Region binden. Das der Mitte der C-Region komplementäre Tetramer C-A-G-G bindet nicht.

D-Region Pos. Nr. 42 - 81

Am 5'-Ende wäre es möglich, daß die beiden Trinukleotide C-G-G mit $K_{CGG} = 6000 \text{ M}^{-1}$ und U-C-G mit $K_{UCG} = 3000 \text{ M}^{-1}$ binden, aber das Tetramer U-C-G-G hat eine Bindungskonstante von $K_{UCGG} = 15000 \text{ M}^{-1}$ und daher einen a-Wert von $a < 2$. Das zur 5S RNS-Sequenz C-G-A-A komplementäre Tetramer U-U-C-G hat einen K-Wert von $K_{UUCG} = 3000 \text{ M}^{-1}$ und $a = 1$, so daß es mit der freien 5S RNS nicht in Wechselwirkung tritt. Im Bereich von Pos. Nr. 58 - 64 ist die 5S RNS für die folgenden Trinukleotide zugänglich:

G-U-U	$K_{GUU} = 2000 \text{ M}^{-1}$
C-G-U	$K_{CGU} = 3000 \text{ M}^{-1}$
G-C-G	$K_{GCG} = 4900 \text{ M}^{-1}$
C-G-G	$K_{CGG} = 6000 \text{ M}^{-1}$

Zwei Nukleotide weiter, von Pos. Nr. 67 - 72 binden die Trinukleotide C-G-C mit $K_{CGC} = 5300 \text{ M}^{-1}$ und G-C-G mit $K_{GCG} = 4900 \text{ M}^{-1}$, während das Tetramer G-C-G-C mit $K_{GCGC} = 47000 \text{ M}^{-1}$ und einem a-Wert von $a = 4,6$ mit dieser Region in Wechselwirkung tritt. Ferner binden die beiden benachbarten Trinukleotide G-G-C mit $K_{GGC} = 5000 \text{ M}^{-1}$ und G-G-G mit $K_{GGG} = 6000 \text{ M}^{-1}$.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß in der D-Region zwei Bereiche für eine Oligonukleotidbindung zugänglich sind, nämlich der Bereich von Pos. Nr. 67 - 72.

E-Region Pos. Nr. 82 - 86

E'-Region Pos. Nr. 90 - 93

Die E-E'-Region ist in der Abb. 6 als basengepaarter Bereich dargestellt, wobei nur G-C-Basenpaare die Helix zusammenhalten. Solch ein Bereich sollte schwer zugänglich für eine Bindung von Oligonukleotiden sein. Tatsächlich bindet in der E-Region das Trinukleotid C-C-C nicht.

In der E'-Region könnten, wie bereits im Abschnitt über die C-Region gesagt, die beiden C's in Position 90 und 91 von der G-Region her zugänglich sein.

F-Region Pos. Nr. 87 - 89

Diese Region stellt zumindest nach dem Schema in Abb. 6 einen sogenannten "hairpin-loop" dar. Solch ein RNS-Einzelstrang sollte für eine Oligonukleotidbindung zugänglich sein. Die beiden Trinukleotide G-A-G und G-G-A binden wahrscheinlich dort. Die Bindungskonstanten betragen $K_{GAG} = 4000 \text{ M}^{-1}$ und $K_{GGA} = 7500 \text{ M}^{-1}$. Es sei darauf hingewiesen, daß das Trinukleotid G-G-A auch in der B-Region bindet.

G-Region Pos. Nr. 94 - 109

Die G-Region verbindet die beiden basengepaarten Regionen E' und A'. In dieser Region binden die beiden Trinukleotide U-C-G mit $K_{UCG} = 3000 \text{ M}^{-1}$ und C-G-C mit $K_{CGC} = 5300 \text{ M}^{-1}$. Das Tetramer U-C-G-G hat nur eine Bindungskonstante von $K_{UCGG} = 15000 \text{ M}^{-1}$ und einen α -Wert von $\alpha < 2$, bindet also nicht, so daß man berechtigt annehmen kann, daß die beiden Trinukleotide in der G-Region binden. Es ist ziemlich unwahrscheinlich, daß das Tetramer A-U-G-G auch in der G-Region und E'-Region bindet, da dafür die G-C reiche Helix aufgeschmolzen werden müßte.

In der Abb. 6 sind die Bindungsbereiche der Oligonukleotide nach LEWIS und DOTY (1970) durch die die dünnen Linien gekennzeichnet. Ein Vergleich der Daten dieser Autoren mit dem hier dargestellten findet im Diskussionsteil statt (siehe 4.1.1.).

Tabelle 2 Bindungsdaten der Oligonukleotide an 5S RNS, 5S RNS-Protein-Komplex von E.coli

Erläuterung:

- 1 Oligonukleotidsequenz
- 2 Positionsnummern
- 3 5S RNS-Antisequenz
- 4 Bindungskonstante K (M^{-1}): freie 5S RNS
- 5 Bindungskonstante K (M^{-1}): 5S RNS-Protein-Komplex
- 6 Bindungskonstante K (M^{-1}): 5S RNS-Protein-Komplex + GTP

1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
A-Region Pos. Nr. 1 - 10						A'-Region Pos. Nr. 110 - 120					
G C A	1 -	3	U G C	1 800	0	C A G	110 -	112	C U G	3 300	0
G G C	2 -	4	G C C	5 000	0	G C A	111 -	113	U G C	1 800	0
A G G	3 -	5	C C U	7 200	0	G G C	112 -	114	G C C	5 000	0
C A G G	3 -	6	C C U G	14 000	0	U G G	113 -	115	C C A	3 000	0
C A G	4 -	6	C U G	3 300	0	C U G	114 -	116	C A G	0	0
C C A	5 -	7	U G G	0	2 300	C C U	115 -	117	A G G	1 000	0
G C C	6 -	8	G G C	3 400	8 300	G C C	116 -	118	G G C	3 400	8 300
C G C	7 -	9	G C G	5 300	0	U G C	117 -	119	G C A	0	0
C C G	8 -	10	C G G	0	0	A U G	118 -	120	C A U	2 300	0
G C C	9 -	11	G G C	3 400	8 300						

B-Region Pos. Nr. 11 - 27						C-Region Pos. Nr. 28 - 41					
1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
C G G	11 - 13	C C G	6 000	3 600	5 400	G G G	26 - 28	C C C	-	-	-
A C G G	11 - 14	C C G U	1 000	75 000	81 000	U G G	27 - 29	C C A	3 000	3 000	0
A C G	12 - 14	C G U	2 000	9 000	0	G U G	28 - 30	C A C	2 000	0	0
U A C	13 - 15	G U A	0	0	-	G G U G	28 - 31	C A C C	18 000	0	0
C U A	14 - 16	U A G	0	3 600	0	G G U	29 - 31	A C C	4 900	0	0
G C U	15 - 17	A G C	1 600	8 000	0	A G G U	29 - 32	A C C U	26 500	0	-
C G C	16 - 18	G C G	5 300	0	0	A G G	30 - 32	C C U	7 200	0	0
G C G C	16 - 19	G C G C	47 000	20 000	-	C A G G	30 - 33	C C U G	0	0	-
G C G	17 - 19	C G C	4 900	4 400	0	C A G	31 - 33	C U G	3 300	0	0
C G C	18 - 20	G C G	5 300	0	0	U C A	32 - 34	U G A	1 000	0	2 300
C C G	19 - 21	C G G	0	0	0	G U C	33 - 35	G A C	1 000	0	-
A C C	20 - 22	G G U	1 500	0	14 000	G G U	24 - 26	A C C	14 800	0	0
C A C	21 - 23	G U G	9 400	0	0	G G G	35 - 37	C C C	-	-	-
C C A	22 - 24	U G G	1 000	2 300	0	G G G	36 - 38	C C C	-	-	-
A C C	23 - 25	G G U	1 500	0	14 000	U G G	37 - 39	C C A	3 000	42 000	0
G A C C	23 - 26	G G U C	3 000	0	-	A U G G	37 - 40	C C A U	12 100	0	-
G A C	24 - 26	G U C	2 500	3 800	3 000	A U G	38 - 41	C A U	2 300	0	0
G G A	25 - 27	U C C	5 000	0	0	C A U	39 - 42	A U G	0	4 000	2 000
						G C A	40 - 42	U G C	1 800	0	0

Fortsetzung Tab. 2 Bindungsdaten der Oligonukleotide an 5S RNS, 5S RNS-Protein-Komplex von E.coli

1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
D - Region Pos. Nr. 42 - 81											
G G C	41 - 43	G C C	7 800	0	0	G C G	60 - 62	C G C	4 900	4 400	0
C G G	42 - 44	G C C	11 000	4 500	5 400	G G C	61 - 63	G C C	5 000	0	0
U C G G	42 - 45	C C G A	15 000	0	-	C G G	62 - 64	C C G	6 000	4 500	5 400
U C G	43 - 45	C G A	3 000	11 000	0	A C G G	62 - 65	C C G U	1 000	75 000	81 000
U U C G	43 - 46	C G A A	3 000	22 000	0	A C G	63 - 65	C G U	2 000	9 000	5 400
U U C	44 - 46	G A A	0	0	0	U A C	64 - 66	G U A	0	0	-
G U U	45 - 47	A A C	2 000	12 000	0	C U A	65 - 67	U A G	0	3 800	0
A G U	46 - 48	A C U	0	0	-	G C U	66 - 68	A G C	0	8 000	0
G A G	47 - 49	C U C	4 000	4 300	1 250	C G C	67 - 69	G C G	5 300	0	0
U G A	48 - 50	U C A	0	0	-	G C G C	67 - 70	G C G C	47 000	20 000	-
C U G	49 - 51	C A G	0	0	-	G C G	68 - 70	C G C	4 900	4 400	0
U C U	50 - 52	A G A	0	0	-	G G C	69 - 71	G C C	5 000	0	0
U U C	51 - 53	G A A	0	0	-	C G G	70 - 72	C C G	6 000	4 500	5 400
C U U	52 - 54	A A G	0	0	-	U C G G	70 - 73	C C G A	15 000	31 000	-
A C U	53 - 55	A G U	1 000	0	-	U C G	71 - 73	C G A	3 000	11 000	1 000
C A C	54 - 56	G U G	9 400	0	0	A U C G	71 - 74	C G A U	2 000	0	-
U C A	55 - 57	U G A	1 000	0	2 300	A U C	72 - 74	G A U	0	0	0
U U C A	55 - 58	U G A A	0	0	-	C A U	73 - 75	A U G	0	4 000	2 000
U U C	56 - 58	G A A	0	0	-	C C A	74 - 76	U G G	1 000	2 300	0
U U U	57 - 59	A A A	0	0	2 000	A C C	75 - 77	G G U	1 500	0	14 000
G U U	58 - 60	A A C	2 000	12 000	0	U A C	76 - 78	G U A	0	0	-
C G U	59 - 61	A C G	3 000	0	0	C U A	77 - 79	U A G	0	3 600	0

Fortsetzung Tab. 2 Bindungsdaten der Oligonukleotide an 5S RNS, 5S RNS-Protein-Komplex von E.coli

1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
A C U	78 - 80	A G U	1 000	0	-	G-Region Pos. Nr. 94 - 109					
C A C	79 - 81	G U G	9 400	0	0	U G G	92-94	C C A	2 000	3 000	0
E-Region Pos. Nr. 82 - 86						A U G G	92-95	C C A U	12 100	0	-
A C A	80 - 82	U G U	0	0	0	A U G	93-95	C A U	3 500	0	0
C A C	81 - 83	G U G	9 400	0	0	C A U	94-96	A U G	0	4 000	0
C C A	82 - 84	U G G	0	2 300	0	G C A	95-97	U G C	1 500	0	0
C C C	83 - 85	G G G	2 000	5 000	0	C G C	96-98	G C G	5 300	0	0
C C C	84 - 86	G G G	2 000	5 000	0	U C G	97-99	C G A	3 000	11 000	11 000
A C C	85 - 87	G G U	1 500	0	0	C U C	98-100	G A G	0	0	0
E'-Region Pos. Nr. 90 - 93						U C U	99-101	A G A	0	0	-
G G G	90 - 92	C C C	-	-	-	C U C	100-102	G A G	0	0	-
G G G	91 - 93	C C C	-	-	-	A C U	101-103	A G U	1 000	0	-
F-Region Pos. Nr. 87 - 89						U A C	102-104	G U A	0	0	-
G A C	86 - 88	G U C	2 500	3 800	5 000	C U A	103-105	U A G	0	3 800	-
A G A	87 - 89	U C U	1 000	7 800	8 000	C C U	104-106	A G G	2 500	1 900	0
G A G	88 - 90	C U C	4 000	4 300	1 200	C C C	105-107	G G G	2 000	5 000	0
G G A	89 - 91	U C C	7 500	0	0	U C C	106-108	G G A	0	0	0
						U U C	107-109	G A A	0	0	-
						G U U	108-110	A A C	2 000	12 000	0
						A G U	109-111	A C U	0	0	-

3.3.2. Bindungsdaten am E.coli 5S RNS-Protein-Komplex

Der rekonstituierte 5S RNS-Protein-Komplex enthält die Proteine E-L5, E-L18, E-L25 und in Spuren die Proteine E-L27 und E-L30. Die Bindungsstellen der drei am stärksten bindenden Proteine befinden sich nach ZIMMERMANN (1975) in folgenden Regionen.

E-L5	:	Pos. Nr.	24 - 51	(B,C,D Region)
E-L18	:	Pos. Nr.	57 - 102	(D,E,F,E',G Region)
E-L25	:	Pos. Nr.	108 - 116	(G, A'Region)

Die Bindungsdaten werden wieder regionenweise vorgestellt (vgl. Tab. 2 und Abb. 6).

A-Region Pos. Nr. 1 - 20

A'-Region Pos. Nr. 110 - 120

In der A-Region binden die beiden Nukleotide G-C-C und C-C-A mit $K_{GCC} = 8\ 300\ M^{-1}$ und $K_{GCA} = 2\ 300\ M^{-1}$. Die Antisequenz G-G-C kommt in der A-Region zweimal vor. Da keine Tetramerbindung vorliegt, kann nicht eindeutig gesagt werden, ob dieser Bereich wirklich zugänglich ist. Die Antisequenz G-G-C kommt noch einmal in der A'-Region vor. Das Trinukleotid C-C-U bindet nicht in der A'-Region, da die Bindungskonstante für ein doppeltes G-C-Basenpaar zu gering ist.

B-Region Pos. Nr. 11 - 27

Die B-Region ist sehr variabel; die Homologie beträgt nur 22 %. Es ist möglich, daß das Tetramer A-C-G-G mit $K_{ACGG} = 75\ 000\ M^{-1}$ und $a = 5,9$ in der Pos. Nr. 11 - 14 bindet. Allerdings findet sich in der D-Region im variablen Teil Pos. Nr. 62 - 65 ebenfalls eine zum Tetramer A-C-G-G entsprechende Antisequenz, so daß der Bindungsbereich für dieses Tetramer nicht entschieden werden kann. In der B-Region kommt als variabler Bereich in der Pos. Nr. 16 - 19 die 5S RNS-Antisequenz G-C-G-C vor. Das kom-

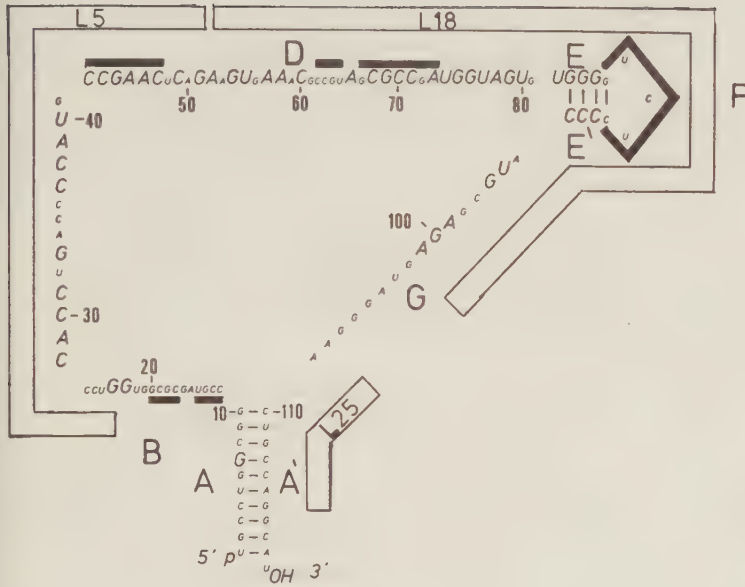


Abb. 6 Oligonukleotidbindungsgebiete am
5S RNS-Protein-Komplex von E.coli

plementäre Tetramer G-C-G-C hat eine Bindungskonstante von $K_{GCGC} = 20\ 000\ M^{-1}$ und $a = 4,5$. Die 5S RNS-Antisequenz G-C-G-C kommt im konservierten Bereich in der D-Region (Pos. Nr. 67 - 70) vor. Da in diesem Bereich auch die benachbarten Oligonukleotide binden, wird für G-C-G-C ein Bindungsbereich in der D-Region vorgeschlagen.

In der B-Region sind die Antisequenzen für die beiden Triplets C-U-A und G-C-U vorhanden. Diese beiden Triplets haben folgende Bindungskonstanten: $K_{CUA} = 3\ 800\ M^{-1}$ und $K_{GCU} = 8\ 000\ M^{-1}$. Diese Antisequenzen gehören in der B-Region zum variablen Teil, während sie in der D-Region homolog sind. Diese beiden Trinukleotide scheinen in der D-Region um Pos. Nr. 65 - 68 zu binden, da auch sehr nah benachbarte Bereiche in dieser Region für eine Bindung zugänglich sind.

C-Region Pos. Nr. 28 - 41

In der C-Region bindet kein Oligonukleotid. Das Trinukleotid U-G-G hat nur eine sehr geringe Bindungskonstante von $K_{UGG} = 3\ 000\ M^{-1}$. Das Tetramer G-G-U-G hat einen K-Wert von $K_{GGUG} = 3\ 000\ M^{-1}$, bindet also nicht. Die beiden benachbarten Trinukleotide zu C-A-U, nämlich A-U-G und G-C-A, binden nicht, während C-A-U eine Bindungskonstante von $K_{CAU} = 4\ 000\ M^{-1}$ hat. Es ist möglich, daß C-A-U in der D-Region im Bindungsbereich um Pos. Nr. 70, nämlich Pos. Nr. 73 - 75, bindet, obwohl die beiden direkt benachbarten Trinukleotide nicht bzw. schwach mit der 5S RNS in Wechselwirkung treten: $K_{AUC} = 0\ M^{-1}$ und $K_{CCA} = 2\ 300\ M^{-1}$, während um Pos. Nr. 70 ein Bindungsbereich vorhanden ist.

Das Tetramer A-U-G-G bindet nicht in der C-Region.

D-Region Pos. Nr. 42 - 81

Gleich am Anfang der D-Region binden die beiden Tetramere U-C-G-G mit $K_{UGCG} = 31\ 000\ M^{-1}$ und $a = 2$ und U-U-C-G mit

$K_{UUCG} = 22\,000\,M^{-1}$ und $a = 2$. Allerdings muß gesagt werden, daß es sich um die untere Grenze für eine mittlere Bindung handelt. Eigenartigerweise bindet das Trinukleotid U-U-C nicht, während G-U-U mit $K_{GUU} = 12\,000\,M^{-1}$ bindet.

Die Pos. Nr. 62 - 65 ist für das Tetramer A-C-G-G mit $K_{ACGG} = 75\,000\,M^{-1}$ und $a = 5,9$, also eine starke Bindung, zugänglich. Die Position 65 - 68 könnte zugänglich sein für die beiden Trinukleotide C-U-A und G-C-U mit $K_{CUA} = 3\,800\,M^{-1}$ und $K_{GCU} = 8\,000\,M^{-1}$ (vgl. Abschnitt B-Region).

Der Bereich zwischen Pos. Nr. 67 - 73 ist für die beiden Tetramere U-C-G-G mit $K_{UCCG} = 31\,000\,M^{-1}$ und $a = 2$ und G-C-G-C mit $K_{GCCG} = 20\,000\,M^{-1}$ und $a = 4,5$ (also eine obere mittlere Bindung) zugänglich (vgl. Abschnitt B-Region).

Das Trinukleotid C-A-U bindet in der Pos. Nr. 73-75 (vgl. Abschnitt C-Region).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß in der D-Region die vorwiegend von Protein E-L5 geschützte Pos. Nr. 42 - 47 zur Basenpaarung mit externen Oligonukleotiden zugänglich ist. Ferner ist die Pos. Nr. 73 - 75, die zum Bindungsbereich des Proteins E-L18 gehört, für eine Basenpaarung ausgerichtet. Wie schon erwähnt, könnte das Tetramer A-C-G-G auch in der B-Region binden, ebenso die beiden Trinukleotide G-C-U und C-U-A.

E -Region Pos. Nr. 82 - 86

E'-Region Pos. Nr. 90 - 93

Diese Region ist für eine Oligonukleotidbindung nicht zugänglich. Die Bindungskonstante von C-C-C mit $K_{CCC} = 5\,000\,M^{-1}$ ist für ein dreifaches G-C-Basenpaar zu gering.

F-Region Pos. Nr. 87 - 89

Die F-Region, die eine Einzelstrangschleife darstellt und von Protein gegen RNase-Angriff geschützt wird, ist wohl für die Trinukleotide G-A-C, A-G-A und G-A-G zugänglich:

$$\begin{aligned}K_{GAC} &= 3\,800\, \text{M}^{-1} \\K_{AGA} &= 7\,800\, \text{M}^{-1} \\K_{GAG} &= 4\,300\, \text{M}^{-1}\end{aligned}$$

Die 5S RNS-Sequenz U-C-U kommt nur in der F-Region vor, während die Antisequenz für G-A-C in der D-Region zu finden ist. Allerdings binden die benachbarten Oligonukleotide dort nicht. Die Bindungskonstante für A-G-A $K_{AGA} = 7\,800\, \text{M}^{-1}$ ist sehr hoch.

G-Region Pos. Nr. 94 - 109

Die G-Region wird bis zur Pos. Nr. 102 von Protein E-L18 geschützt, ferner von Pos. Nr. 108 bis Pos. Nr. 116 in der A'-Region vom Protein E-L25.

In der G-Region findet keine Wechselwirkung mit Oligonukleotiden statt.

3.3.3. Vergleich der Oligonukleotidbindungsdaten zwischen freier 5S RNS und 5S RNS-Protein-Komplex aus E.coli

Durch die Anlagerung der Bindungsproteine an die RNS treten bei dieser Konformationsänderungen auf, indem neue Bindungsorte entstehen. Bei der Interpretation muß man darauf achten, daß nur das Auftreten neuer Bindungsorte für Oligonukleotide notwendigerweise auf eine Konformationsänderung der RNS zurückzuführen ist. Verschwinden einige Bindungsorte durch die Anlagerung der Proteine, so kann es zum einen an der Konformationsänderung der RNS liegen, zum andern aber auch daran, daß die Proteine die Bindungsstellen auf der RNS bedecken.

Im Übergang von der B-Region zur C-Region findet im Komplex keine Bindung mit Oligonukleotiden mehr statt. Ferner ist in der gesamten C-Region nach Anlagerung der Proteine keine Bindung mit Oligonukleotiden mehr möglich.

In der D-Region findet gleich zu Anfang im konservierten C-C-G-A-A-C-Bereich eine starke Zunahme der Bindungskonstanten im Komplex statt. Das Tetramer U-C-G-G bindet mit $K_{\text{UCGG}} = 31\,000\text{ M}^{-1}$, während es in der freien 5S RNS eine Bindungskonstante von $K_{\text{UCGG}} = 15\,000\text{ M}^{-1}$ hat. Das benachbarte Tetramer U-U-C-G bindet mit $K_{\text{UUCG}} = 22\,000\text{ M}^{-1}$ und $a = 2$, stellt also eine mittlere Bindung dar. Die Bindungskonstante von G-U-U vergrößert sich um den Faktor 6 auf $K_{\text{GUU}} = 12\,000\text{ M}^{-1}$.

Der Bindungsbereich bei Pos. Nr. 58 - 64 verschiebt sich im Komplex in den großen Bindungsbereich von Pos. Nr. 62 - 75. Der in der freien 5S RNS vorkommende Bindungsbereich von Pos. Nr. 67 - 72 erweitert sich im Komplex auf eine Länge von 14 Nukleotiden, nämlich Pos. Nr. 62-75. Die Bindungskonstante von G-C-G-C mit $K_{\text{GCGC}} = 47\,000\text{ M}^{-1}$ in der freien 5S RNS verringert sich auf $K_{\text{GCGC}} = 20\,000\text{ M}^{-1}$ im Komplex.

Auffällig ist im Komplex die Zugänglichkeit für Trinukleotidbindung in der F-Region. Diese Region ist vollständig für eine externe Basenpaarung ausgerichtet. Die Bindungskonstante von A-G-A erhöht sich um das 7,8-fach im 5S RNS-Protein-Komplex.

In der G-Region bildet sich kein neuer Bindungsbereich durch die Proteinanlagerung aus, im Gegenteil, der Bereich um Pos. Nr. 94 - 99 verschwindet dabei.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß ungefähr zwei Oligonukleotidbindungsgebiete nach Anlagerung der Bindungsproteine an die 5S RNS erhalten bleiben (5S RNS frei Pos. Nr. 58 - 64 und Pos. Nr. 67 - 72; 5S RNS-Komplex Pos. Nr. 62 - 75), während zwei neue entstehen (Pos. Nr. 42 - 47 und Pos. Nr. 86 - 90) und drei verschwinden (Pos. Nr. 25 - 32, Pos. Nr. 37 - 40 und Pos. Nr. 94 - 99).

3.3.4. Bindung von Oligonukleotiden am E.coli
5S RNS-Protein-Komplex in Gegenwart von GTP

3.3.4.1. Durchführung der Bindungsversuche

Der 5S RNS-Protein-Komplex ist ein Enzymkomplex, der GTP und ATP zu hydrolysieren vermag. Diese beiden Nukleotid-triphosphate werden in zwei verschiedenen Zentren in ihre Diphosphate gespalten. Beide Enzymaktivitäten inhibieren sich in nichtkompetitiver Art und Weise (GAUNT-KLOEPFER und ERDMANN, 1975).

Um nun festzustellen, ob solche enzymatische Funktionen einen Einfluß auf die Struktur der RNS haben, wurde in Gegenwart von GTP die Oligonukleotidbindung gemessen.

Da die Oligonukleotide Ammoniumcetat enthalten, kam es bei der hohen GTP-Konzentration 1,7mM, die in dem normalen GTPase Test optimal ist, zur Bildung des unlöslichen Mg^{++} -(Ammonium)-phosphates, das die Membranen undurchlässig werden ließ. Daher wurden die GTP-Konzentration auf 47 μ M herabgesetzt. Auf Cellulose-Dünnschicht-platten konnte unter diesen Bedingungen die GTP-Hydrolyse qualitativ nachgewiesen werden. 1 A₂₆₀ Einheit 5S RNS-Protein-Komplex wurde in Anwesenheit von 47 μ M GTP für 30 Min. bei 37°C inkubiert und danach schnell auf 0°C abgekühlt. Anschließend wurden jeweils 40 μ l dieses 5S RNS-Protein-Komplexes in die auf 4°C vorgekühlten Dialysekammern gegeben. Die GTP-Konzentration wurde bereits am Start der Dialyse in beide Kammern auf 47 μ M eingestellt.

3.3.4.2. Oligonukleotidbindungsdaten vom E.coli
5S RNS-Protein-Komplex in Gegenwart von GTP

Gibt man zum 5S RNS-Protein-Komplex die angegebene Menge GTP und inkubiert bei der optimalen Temperatur, so ergibt die Vermessung mit den komplementären Oligonukleotiden ein stark abweichendes Bild gegenüber dem GTP-freien Komplex (Tab. 2).

Als erstes fällt auf, daß das Tetramer A-C-G-G mit $K_{ACGG} = 81\,000\,M^{-1}$ bindet (Region B und D), während das Tetramer U-U-C-G, das am Anfang der D-Region im Komplex bindet, keine Bindung aufweist. Inwieweit nun das GTP selbst die Bindungsstellen besetzt hat oder ob durch die GTP-Hydrolyse eine drastische Konformationsänderung eingetreten ist, kann noch nicht entschieden werden. Die F-Region tritt weiterhin mit den Oligonukleotiden in Wechselwirkung, da die beiden Trinukleotide A-G-A und G-A-C mit $K_{AGA} = 8\,000\,M^{-1}$ und $K_{GAC} = 5\,000\,M^{-1}$ binden. Diese Bindungskonstanten sind etwas höher als beim 5S RNS-Protein-Komplex ohne GTP.

3.4. Bindungsdaten der Tripletts und Tetramere an Bac.stearothermophilus 5S RNS und 5S RNS-Protein-Komplex

3.4.1. Bindungsdaten an der proteinfreien 5S RNS Bac.stearothermophilus

3.4.1.1. Erläuterung zur Bac.stearothermophilus 5S RNS Sequenz

Eine vorläufige 5S RNS Sequenz ist von MAROTTA et al. (1973) veröffentlicht worden. In dieser Sequenz sind die Regionen von Pos. Nr. 17 - 23, 50 - 53 und 59 - 69 in ihrer Nukleotidzusammensetzung, aber nicht in ihrer Sequenz bekannt. Später ist eine weitere 5S RNS-Sequenz publiziert worden (FEBS-Symposium 1975, Paris, STANLEY und PENSWICK), die sich von der ersteren unterscheidet. Die Unterschiede dieser beiden 5S RNS Sequenzen sind in der Tab. 3 dargestellt.

Tab. 3

MAROTTA et al.		STANLEY et al.	
6	10	6	10
U-G-A-C-A		U-G-G-U-G	
15	26	17	27
C-G-A-G-A-G-A-G-G-A-A-A		C-G-G-A-G-G-G-G-A-A-A	
30	37	30	37
C-C-G-U-C-U-C-C		C-G-U-U-C-C-C-A	
56	66	55	64
A-A-G-C-U-C-U-C-C-C-A		A-A-G-C-C-C-U-C-C-A	
109	116	107	114
U-G-U-C-G-C-U-A		U-C-G-C-U-G-C-U	

Die 5S RNS-Sequenz der beiden Autoren unterscheiden sich auch in ihrer Länge, nämlich die Sequenz von MAROTTA hat 119 Nukleotide, während die Sequenz von STANLEY 117 Nukleotide enthält. Daher sind die in der Tab. 3 aufgeführten Positionsnummern unterschiedlich. In unserem Labor (ZIMMERMANN, Dissertation, 1975) konnten durch eigene Sequenzuntersuchungen die Sequenz von STANLEY fast vollständig bestätigt werden.

Die Sequenz von ZIMMERMANN ist um ein Nukleotid länger nämlich 118 Nukleotide. Der Unterschied in den beiden Sequenzen ist in dem mittleren Bereich der D-Region zu finden (siehe auch Abb. 7)

STANLEY	Pos. Nr.	ZIMMERMANN
G-C-C-C-U-C-C-A	57 - 65	G-C-U-C-U-C-C-C-A

Für die Auswertung der Oligonukleotidbindungsdaten wird die von ZIMMERMANN angegebene 5S RNS-Sequenz benutzt.

3.4.1.2. Bindungsdaten von Oligonukleotiden an der freien RNS von Bac.stearothermophilus

Die 5S RNS von Bac.stearothermophilus läßt sich ebenfalls in sieben Regionen A-G einteilen, wobei A-A` und E-E` basen-gepaarte Regionen darstellen (ERDMANN, 1976). Die Bindungsdaten werden wieder regionenweise erläutert (vgl. Tab. 4 und Abb. 7).



Abb. 7 Oligonukleotidbindungsgebiete in der
freien 5S RNS von Bac.stearothermophilus

 schwache Bindung ($a < 1,9$)

➤ enzymatische Spaltung (RNaseA)
nach ERDMANN, 1976

A-Region Pos. Nr. 1 - 12

A'-Region Pos. Nr. 106 - 118

Die A-Region ist bei Bac.stearothermophilus um zwei Nukleotide länger als bei E.coli, beträgt also 12 Nukleotide, etwas mehr als eine Helixumdrehung.

Die beiden Trinukleotide U-A-G und A-G-G haben einen K-Wert von $K_{UAG} = 6\ 000\ M^{-1}$ und $K_{AGG} = 10\ 000\ M^{-1}$, aber das Tetramer U-A-G-G bindet nicht, da $K_{UAGG} = 4\ 500\ M^{-1}$ und der α -Wert kleiner als 2 ist.

In der A'-Region binden wahrscheinlich die beiden Trinukleotide C-A-G und A-G-C mit $K_{CAG} = 4\ 000\ M^{-1}$ bzw. $K_{AGC} = 5\ 000\ M^{-1}$. Das Trinukleotid C-A-G scheint ebenfalls im Übergang von der E'-Region zur G-Region mit der 5S RNS in Wechselwirkung zu treten, da das Tetramer C-A-G-G mit $K_{CAGG} = 27\ 000\ M^{-1}$ und einem α -Wert von 1,9 sehr schwach in Wechselwirkung tritt (siehe Abschnitt E - E'-Region). Das Trinukleotid U-A-G scheint nicht in der A- bzw. A'-Region zu binden:

U-A-G-G mit $K_{UAGG} = 4\ 500\ M^{-1}$ und α kleiner 2 und

U-A-G-C mit $K_{UAGC} = 3\ 000\ M^{-1}$ und α kleiner 2.

Die α -Werte zeigen an, daß keine Wechselwirkung stattfindet. Es ist allerdings möglich, daß das Trinukleotid U-A-G allein in der A-Region bindet, also entweder in der Pos. Nr. 2 - 4 oder 113 - 115.

B-Region Pos. Nr. 13 - 25

Am Anfang der B-Region binden die zwei Trinukleotide G-C-U mit $K_{GCU} = 3\ 600\ M^{-1}$ und C-G-C mit $K_{CGC} = 4\ 000\ M^{-1}$. Das Trinukleotid C-C-G bindet sehr schwach, $K_{CCG} = 2\ 200\ M^{-1}$, für eine dreifache G-C-Bindung. Daher kann man sagen, daß in der B-Region nur der Bereich von Pos. Nr. 13 - 16 für eine Oligonukleotidbindung zugänglich zu sein scheint.

C-Region Pos. Nr. 26 - 39

In dieser Region gibt es nur einen Bindungsbereich, nämlich von Pos. Nr. 26 - 29. Hier binden die beiden Trinukleotide G-G-U mit $K_{GGU} = 10\,000\text{ M}^{-1}$ und G-U-G mit $K_{GUG} = 9\,000\text{ M}^{-1}$. Das entsprechende Tetramer G-G-U-G bindet mit $K_{GGUG} = 100\,000\text{ M}^{-1}$. Der α -Wert von 5,2 bedeutet also eine positive Bindung.

Das Tetramer A-U-G-G bindet nicht, da der α -Wert kleiner als 2 ist, ebenso das Tetramer A-C-G-G.

D-Region Pos. Nr. 40 - 79

Wie bei E.coli, ist auch bei Bac.stearothermophilus die D-Region am längsten und umfaßt ebenfalls 40 Nukleotide. In dieser Region liegt gleich zu Anfang die konservierte C-G-A-A-C-Sequenz, die bei allen bisher sequenzierten 5S RNS der gleichen Position auftritt. In der proteinfreien 5S RNS ist dieser Teil der Sequenz für die Oligonukleotidbindung nicht zugänglich. Das Tetramer U-U-C-G besitzt ein $K_{UUCG} = 3\,000\text{ M}^{-1}$.

Die D-Region besitzt nur zwei Bereiche, mit denen externe Oligonukleotide eine Basenpaarung eingehen können, nämlich von Pos. Nr. 56 - 60 und 65 - 69. Es binden im Bereich Pos. Nr. 56 - 60 die drei Trinukleotide G-C-U, A-G-C und G-A-G mit den folgenden Assoziationskonstanten:

$$K_{GCU} = 3\,600\text{ M}^{-1}$$

$$K_{AGC} = 5\,000\text{ M}^{-1}$$

$$K_{GAG} = 4\,500\text{ M}^{-1}$$

und das Trinukleotid A-G-A mit $K_{AGA} = 2\,800\text{ M}^{-1}$. Es scheint daher wahrscheinlich, daß das Trinukleotid A-G-C hier und nicht in der A'-Region bindet.

In der Pos. Nr. 58 - 61 bindet das Tetramer A-G-A-G mit einer Bindungskonstanten von $K_{AGAG} = 30\,000\text{ M}^{-1}$ und

$\alpha = 4,1$. Die Bindung des Tetramers A-G-A-G bedeutet, daß die von ZIMMERMANN angegebene Sequenz in dieser Position 59 - 61, die bei STANLEY unsicher ist, die richtige ist.

Der andere Bindungsbereich, Pos. Nr. 65 - 71, ist zugänglich für die Trinukleotide G-C-U, C-G-C und G-C-G mit den folgenden Bindungskonstanten:

$$K_{GCU} = 3\,600\, M^{-1}$$

$$K_{CGC} = 4\,000\, M^{-1}$$

$$K_{GCG} = 3\,500\, M^{-1}$$

Das Tetramer G-C-G-C bindet mit einer Konstante von $K_{GCGC} = 70\,900\, M^{-1}$, was eine starke Bindung bedeutet, da der α -Wert 10 ist. In der Pos. Nr. 69 - 72 findet keine Bindung statt. Das Tetramer U-C-G-G hat einen K-Wert von $10\,000\, M^{-1}$ und da $K_{UCG} = 0\, M^{-1}$ und $K_{CGG} = 11\,000\, M^{-1}$, entspricht dieses einem α -Wert von 0,9. Es ist daher anzunehmen, daß die Bindung von U-C-G-G nur über das Trinukleotid C-G-G erfolgt, während das U nicht an der Basenpaarung beteiligt ist.

Zusammenfassend läßt sich für die D-Region sagen, daß zwei Oligonukleotidbindungsgebiete, nämlich Pos. Nr. 56 - 61 und 65 - 71, vorhanden sind.

E -Region Pos. Nr. 80 - 85

E'-Region Pos. Nr. 90 - 94

Die E-E'-Region ist wie bei der E.coli 5S RNS als eine basengepaarte Region dargestellt. Es ist allerdings nicht sicher, ob die freie 5S RNS in Lösung wirklich in dieser Form vorliegt. Betrachtet man die Oligonukleotidbindungsdaten, so ist diese Region für eine Basenpaarung mit Tri- und Tetranukleotiden nicht ausgerichtet. Allerdings könnte es möglich sein, daß die am 3'-Ende der E'-Region liegenden beiden C's mit A-G-G in Wechselwirkung treten,

wobei das A mit dem U vom 5'-Ende der G-Region eine Basenpaarung eingeht. Die Bindungskonstante beträgt $K_{AGG} = 10\,000\text{ M}^{-1}$. Das Tetramer C-A-G-G hat einen K-Wert von $K_{CAGG} = 27\,000\text{ M}^{-1}$ und einen a-Wert von 1,9, so daß eine schwache Wechselwirkung stattfinden könnte.

F-Region Pos. Nr. 95 - 105

Die F-Region ist um ein Nukleotid länger als die entsprechende Region bei E.coli. Diese Region stellt ebenfalls einen "Hairpin loop", also eine Einzelstrangschleife, dar. Es ist nicht auszuschließen, daß das Tetramer G-C-G-C mit $K_{GCGC} = 70\,900\text{ M}^{-1}$ in der Pos. Nr. 88 - 91 bindet. Wie schon erwähnt, bindet das Tetramer auch in der D-Region. Um die Zahl der Bindungsstellen dieses Tetramers an der 5S RNS zu bestimmen, wäre ein "Scatchard Plot" notwendig, der aber nicht durchgeführt werden konnte, weil die entsprechende Assoziationskonstante zu gering war (DERANLEAU, 1969).

G-Region Pos. Nr. 95 - 105

Diese Region ist um fünf Nukleotide kürzer als bei der E.coli 5S RNS.

In dieser Region könnte höchstens das Trinukleotid U-A-C mit $K_{UAC} = 5\,500\text{ M}^{-1}$ binden; allerdings binden nicht die benachbarten Trinukleotide.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß in der freien 5S RNS von Bac.stearothermophilus vier eindeutige Bindungsbereiche für Oligonukleotide zu finden sind, nämlich in Pos. Nr. 13 - 16 (B-Region); 26 - 29 (C-Region); 56 - 61 und 65 - 71 (D-Region). Als drei mögliche Bindungsbereiche sind die Pos. Nr. 88 - 91 (F-Region); 93 - 96 (E'-Region) und 102 - 104 (G-Region) zu nennen.

Tab. 4 Bindungsdaten der Oligonukleotide an der 5S RNS, 5S RNS-Protein-Komplex von Bac.stearothermophilus

Erläuterung:

- 1 Oligonukleotidsequenz
- 2 Positions Nummer
- 3 5S RNS-Antisequenz
- 4 Bindungskonstante $K (M^{-1})$: freie 5S RNS
- 5 Bindungskonstante $K (M^{-1})$: 5S RNS-Protein-Komplex
- 6 Bindungskonstante $K (M^{-1})$: 5S RNS-Protein-Komplex

1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
A-Region Pos. Nr. 1 - 12						A'-Region Pos. Nr. 106 - 118					
A G G	1 - 3	C C U	10 000	13 000	100 000	A C C	105-107	G G U	0	0	16 000
U A G G	1 - 4	C C U A	3 000	0	0	G A C	106-108	G U C	4 600	0	0
U A G	2 - 4	C U A	6 000	2 000	0	C G A	107-109	U C G	2 000	2 000	0
C U A	3 - 5	U A G	0	4 000	0	G C G	108-110	C G C	3 500	5 000	27 000
A C U	4 - 6	A G U	0	0	11 000	A G C	109-111	G C U	5 000	0	-
C A C	5 - 7	G U G	0	0	13 800	C A G	110-112	C U G	4 000	0	21 500
C C A	6 - 8	U G G	0	5 000	19 100	G C A	111-113	U G C	0	2 340	39 000
A C C A	6 - 9	U G G U	0	-	-	A G C	112-114	G C U	5 000	3 000	-
A C C	7 - 9	G G U	0	0	16 000	U A G C	112-115	G C U A	0	27 000	-
C A C	8 - 10	G U G	0	0	13 800	U A G	113-115	C U A	6 000	0	84 000
U C A	9 - 11	U G A	2 000	2 200	0	C U A	114-116	U A G	0	4 000	0
A U C	10 - 12	G A U	0	0	-	C C U	115-117	A G G	0	3 700	-
U A U	11 - 13	A U A	0	0	-	G C C	116-118	G G C	0	0	22 000
C U A	12 - 14	U A G	0	4 000	-						

! 58 !

B - Region Pos. Nr. 13 - 25

G C U	13 - 15	A G C	3 600	0	-
C G C	14 - 16	G C G	4 000	5 000	-
C C G	15 - 17	C G G	2 200	0	-
U C C	16 - 18	G G A	0	0	13 000
C U C	17 - 19	G A G	0	0	27 100
C C U	18 - 20	A G G	0	3 700	-
C C C	19 - 21	G G G	0	12 800	0
C C C	20 - 22	G G G	0	12 800	0
U C C	21 - 23	G G A	0	0	-
U U C	22 - 24	G A A	0	8 000	-
U U U	23 - 25	A A A	0	4 800	0
G U U	24 - 26	A A C	0	0	12 000

C - Region Pos. Nr. 26 - 39

U G U	25 - 27	A C A	0	0	13 300
G U G	26 - 28	C A C	9 000	0	50 000
G G U G	26 - 29	C A C C	100 000	0	-
G G U	27 - 29	A C C	10 000	8 000	143 000
G G G	28 - 30	C C C	-	-	-
C G G	29 - 31	C C G	11 000	3 000	146 000
A C G G	29 - 32	C C G U	18 600	81 000	-
A C G	30 - 32	C G U	0	6 000	35 000
A A C	31 - 33	G U U	0	0	28 000

D - Region Pos. Nr. 40 - 79

G A A	32 - 34	U U C	3 000	5 900	0
G G A	33 - 35	U C C	0	0	0
G G G	34 - 36	C C C	-	-	-
U G G	35 - 37	C C A	9 900	20 000	9 000
A U G G	35 - 38	C C A U	15 600	18 000	-
A U G	36 - 38	C A U	1 500	3 500	72 000
G A U	37 - 39	A U C	0	0	11 100
G G A	38 - 40	U C C	0	0	0
G G G	39 - 41	C C C	-	-	-

C G G	40 - 42	C C G	11 000	3 000	146 000
U C G G	40 - 43	C C G A	8 000	14 600	-
U C G	41 - 43	C G A	0	4 000	24 500
U U C G	41 - 44	C G A A	3 000	135 000	-
U U C	42 - 44	G A A	0	8 000	-
G U U	43 - 45	A A C	0	10 000	12 000
U G U	44 - 46	A C A	0	0	13 000
G U G	45 - 47	C A C	9 000	0	60 000
C G U	46 - 48	A C G	0	0	16 800
C C G	47 - 49	C G G	2 200	0	-
U C C	48 - 50	G G A	0	0	13 000
U U C	49 - 51	G A A	2 000	8 000	-
C U U	50 - 52	A A G	2 500	10 000	-
A C U	51 - 53	A G U	0	0	11 100

1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
A A C	52 - 54	G U U	0	0	28 000	C C A	73 - 75	U G G	0	5 000	19 000
U U A A	53 - 56	U U A A	4 200	0	11 100	A C C	74 - 76	G G U	0	0	16 000
U A A	53 - 55	U U A	0	0	-	U A C	75 - 77	G U A	5 500	0	-
U U A	54 - 56	U A A	0	0	-	C U A	76 - 78	U A G	0	4 000	0
C U U	55 - 57	A A G	2 500	10 000	-	A C U	77 - 79	A G U	0	0	11 000
G C U	56 - 58	A G C	3 600	0	24 900	A A C	78 - 80	G U U	0	0	28 000
A G C	57 - 59	G C U	5 000	3 000	-	E-Region Pos. Nr. 80 - 85					
G A G	58 - 60	C U C	4 500	4 000	66 000						
A G A G	59 - 61	C U C U	30 000	30 000	-						
A G A	59 - 61	U C U	2 800	10 000	22 000	C A A	79 - 81	U G G	0	0	14 550
G A G	60 - 62	C U C	4 500	4 000	66 000	C C A	80 - 82	U G G	0	5 000	19 100
G G A	61 - 63	U C C	0	0	0	C C C	81 - 83	G G G	0	12 800	4 500
G G G	62 - 64	C C C	-	-	-	C C C	82 - 84	G G G	0	12 800	4 500
U G G	63 - 65	C C A	9 900	20 000	18 000	G C C	83 - 85	G G C	0	0	22 000
C U G	64 - 66	C A G	0	0	43 000	G G C	84 - 86	G C C	0	0	68 000
G C U	65 - 67	A G C	3 600	0	24 900	E'-Region Pos. Nr. 90 - 94					
C G C	66 - 68	G C G	4 000	5 000	80 000	G G C	90 - 92	G C C	0	0	68 000
G C G C	66 - 69	G C G C	70 900	18 500	-	G G G	91 - 93	C C C	-	-	-
G C G	67 - 69	C G C	3 500	5 000	27 000	G G G	92 - 94	C C C	-	-	-
G G C	68 - 70	G C C	0	0	68 000	A G G	93 - 95	C C U	10 000	13 000	100 000
C G G	69 - 71	C C G	11 000	3 000	146 000	C A G G	93 - 96	C C U G	27 000	18 000	-
U C G G	69 - 72	C C G A	8 000	14 600	-	C A G	94 - 96	C U G	4 000	0	21 000
U C G	70 - 72	C G A	0	4 000	24 500						
A U C G	70 - 73	C G A U	3 000	100 000	11 000						
A U C	71 - 73	G A U	0	4 000	11 000						
C A U	72 - 74	A U G	2 250	2 250	10 000						

1

2

3

4

5

6

F - Region Pos. Nr. 86 - 89

U G G	85 - 87	C C A	9 900	20 000	9 000
C U G	86 - 88	C A G	0	0	43 000
G C U	87 - 89	A G C	3 600	0	24 950
C G C	88 - 90	G C G	4 000	5 000	15 000
G C G C	88 - 91	G C G C	70 900	18 500	-
G C G	89 - 91	C G C	3 500	5 000	27 000

G - Region Pos. Nr. 95 - 100

G C A	95 - 97	U G C	0	2 300	39 800
U G C	96 - 98	G C A	4 000	0	-
U U G	97 - 99	C A A	0	5 300	-
C U U	98 - 100	A A G	2 500	10 000	-
U C U	99 - 101	A G A	0	0	17 500
C U C	100 - 102	G A G	0	0	27 400
A C U	101 - 103	A G U	0	0	11 100
U A C	102 - 104	G U A	5 500	0	-
C U A	103 - 105	U A G	0	4 000	0
C C U	104 - 106	A G G	0	3 700	-
A C C U	104 - 107	A G G U	0	17 500	-

3.4.2. Bindungsdaten am nativen 5S RNS-Protein-Komplex
Bac.stearothermophilus

3.4.2.1. Beschreibung des 5S RNS-Protein-Komplexes

Der 5S RNS-Protein-Komplex setzt sich aus den Proteinen B-L5 und B-L22 zusammen, wovon sich B-L5 mit E-L5 und B-L22 mit E-L18 korrelieren läßt, da die beiden Bacillus Proteine in der 2-D-Gelelektrophorese identisch mit den entsprechenden aus E.coli Proteinen laufen (HORNE und ERDMANN, 1972).

Das Protein B-L5 bindet hauptsächlich an der Pos. Nr. 20-79, welche die Regionen B, C und D beinhaltet. Das Protein B-L22 bindet primär in der Region Pos. Nr. 80 - 98, also in der E- und E'-Region sowie in der G-Region bis zur konservierten A-G-A-Sequenz (ZIMMERMANN, 1975).

3.4.2.2. Bindungsdaten der Oligonukleotide am Bac.stearothermophilus 5S RNS-Protein-Komplex

Die Bindungsdaten für die Tri- und Tetranukleotide sind in der Tab. 4 aufgeführt und sollen hier einzeln, nach Regionen geordnet, erläutert werden. (Abb. 8)

A -Region Pos. Nr. 1 - 12

A'-Region Pos. Nr. 106 - 118

Die A-Region ist für eine Oligonukleotidbindung sehr wahrscheinlich zugänglich, da das Trinukleotid A-G-C mit $K_{AGG} = 13\ 000\ M^{-1}$ bindet. Allerdings tritt das entsprechende Tetramer U-A-G-G nicht in Wechselwirkung $K_{UAGG} = 3\ 800\ M^{-1}$.

In der A'-Region bindet das Tetramer U-A-G-C mit $K_{UAGC} = 35\ 000\ M^{-1}$ und $\alpha = 7$; daraus folgt also eine positive Bindung. Es muß gesagt werden, daß die Bindungskonstanten der beiden Trinukleotide ziemlich gering sind. Die beiden

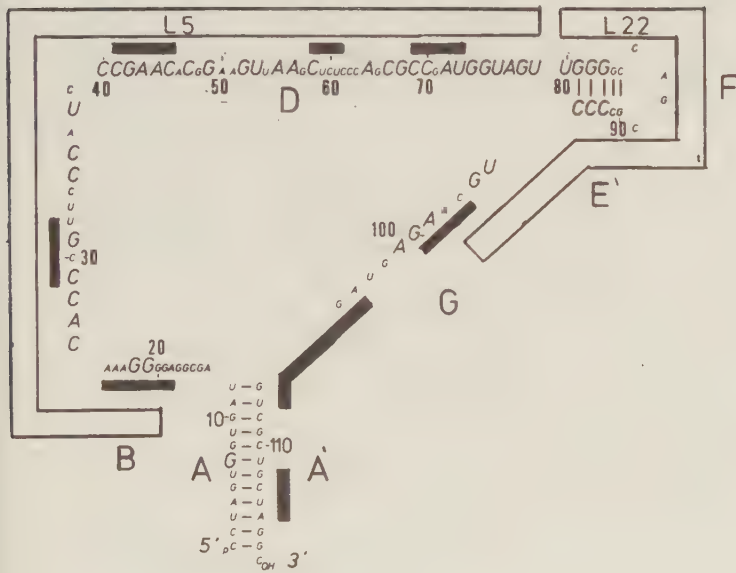


Abb. 8 Oligonukleotidbindungsgebiete im
5S RNS-Protein-Komplex von Bac. stearothermophilus

Trinukleotide C-C-U mit $K_{CCU} = 3\,700\text{ M}^{-1}$ und C-U-A mit $K_{CUA} = 4\,000\text{ M}^{-1}$ also in Pos. Nr. 114 - 117 ebenfalls in der A'-Region binden.

B - Region Pos. Nr. 13 - 25

Von Pos. Nr. 20 beginnt der Bindungsbereich der Proteine, wahrscheinlich B-L5, und erstreckt sich bis Pos. Nr. 79. In der B-Region binden die beiden Trinukleotide C-C-U und C-C-C mit $K_{CCU} = 3\,700$ und $K_{CCC} = 12\,800\text{ M}^{-1}$. Wahrscheinlich binden diese beiden Trinukleotide in der Pos. Nr. 18 - 21. Die beiden Trinukleotide U-U-C und U-U-U binden wohl ebenfalls in der B-Region von Pos. Nr. 22 - 25 mit $K_{UUC} = 8\,000\text{ M}^{-1}$ und $K_{UUU} = 4\,800\text{ M}^{-1}$. Der Bereich von Pos. Nr. 18 - 25 ist für die Oligonukleotidbindung zugänglich.

C - Region Pos. Nr. 26 - 39

Die gesamte C-Region wird vom Protein B-L5 geschützt. In dieser Region bindet nur das Tetramer A-C-G-G mit $K_{ACGG} = 81\,000\text{ M}^{-1}$ und $a = 9$, also eine starke Bindung. Das Tetramer A-U-G-G bindet nicht in der C-Region, da $a = 0,78$, während $K_{AUGG} = 18\,000\text{ M}^{-1}$.

D - Region Pos. Nr. 40 - 79

In der D-Region, die ebenfalls total von Protein geschützt wird, gibt es drei Bindungsbereiche. Der erste Bindungsbereich befindet sich in der Pos. Nr. 41 - 45. Hier bindet das Tetramer U-U-C-G mit $K_{UUCG} = 135\,000\text{ M}^{-1}$ und $a = 11$. Die Trinukleotide U-U-C, U-C-G und G-U-U haben die folgenden Bindungskonstanten:

$$K_{UUC} = 8\,000\text{ M}^{-1}$$

$$K_{UCG} = 4\,000\text{ M}^{-1}$$

$$K_{GUU} = 10\,000\text{ M}^{-1}$$

Der zweite Bindungsort ist zwischen Pos. Nr. 58 - 61. Hier binden die beiden Trinukleotide A-G-A und G-A-G mit $K_{AGA} = 10\,000\text{ M}^{-1}$ und $K_{GAG} = 4\,000\text{ M}^{-1}$. Das Tetramer A-G-A-G bindet mit $K_{AGAG} = 30\,000\text{ M}^{-1}$, also $a = 2,1$. Im dritten Bindungsbereich, der Pos. Nr. 70 - 73 umfaßt, ist dem Tetramer A-U-C-G komplementär. Die Bindungskonstante $K_{AUCG} = 100\,000\text{ M}^{-1}$ mit einem a -Wert von $a = 12$. Das Tetramer U-C-G-G hat einen K -Wert von $K_{UCGG} = 14\,600\text{ M}^{-1}$ und $a = 2,2$ also eine mittlere Bindung.

E -Region Pos. Nr. 80 - 85

E'-Region Pos. Nr. 90 - 94

Die E - E'-Region wird vom Protein B-L22 geschützt. In der E-Region könnte vielleicht das Triplet C-C-C mit $K_{CCC} = 12\,800\text{ M}^{-1}$ binden. Dies ist wegen der sehr wahrscheinlichen Basenpaarung mit der E'-Region nicht zu erwarten. Am 3'-Ende zeigt das Tetramer C-A-G-G eine Assoziationskonstante von $K_{CAGG} = 18\,000\text{ M}^{-1}$, da aber $a = 2$ ist, kann keine Bindung angenommen werden.

F-Region Pos. Nr. 86 - 89

Die F-Region wird ebenfalls total vom Protein geschützt. In der F-Region bindet kein Oligonukleotid. G-C-G-C hat zwar einen K -Wert von $K_{GCGC} = 18\,000\text{ M}^{-1}$, aber der a -Wert ist kleiner als 2.

G - Region Pos. Nr. 95 - 105

In der G-Region reicht der Proteinbindungsbereich bis zu Pos. Nr. 98. Es ist möglich, daß in der Pos. Nr. 97 - 100 die beiden Trinukleotide U-U-G und C-U-U binden, denn $K_{UUG} = 5\,300\text{ M}^{-1}$ und $K_{CUU} = 10\,000\text{ M}^{-1}$. Das Trinukleotid C-U-U könnte allerdings auch noch einmal in der D-Region binden. Das Triplet U-U-G kann aber nur in der G-Region binden. Das Tetramer A-C-C-U bindet mit $K_{ACCU} = 17\,500\text{ M}^{-1}$

am 3'-Ende der G-Region, da $a = 4$.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß beim 5S RNS-Protein-Komplex 9 Bindungsbereiche existieren, nämlich Pos. Nr. 1 - 3 (A-Region); Pos. Nr. 112 - 117 (A'-Region); Pos. Nr. 17 - 25 (B-Region); Pos. Nr. 29 - 32 (C-Region); Pos. Nr. 41 - 45, 58 - 61 und 69 - 73 (D-Region); Pos. Nr. 97 - 100 (G-Region); Pos. Nr. 104 - 107 (G-A'-Region).

3.4.3. Vergleich der Oligonukleotidbindungsdaten an der freien 5S RNS und am 5S RNS-Protein-Komplex von Bac.stearothermophilus

Der Vergleich soll zeigen, inwieweit die ribosomalen 5S RNS Bindungsproteine die Konformation der RNS verändern können. Dies zeigt sich darin, daß neue Bindungsbereiche nach Anlagerung der Proteine auftreten. Dies ist tatsächlich der Fall.

Die A-A'-Region wird nach Anlagerung der Proteine für die Oligonukleotidbindung zugänglich. Hier binden die Trinukleotide A-G-G am Anfang der A-Region und C-C-U und C-U-A in der A'-Region. Ebenso bindet das Tetramer U-A-G-C in der A'-Region.

In der B-Region verschiebt sich ein Bindungsbereich bei der freien 5S RNS vom 5'-Ende zum 3'-Ende, wobei sich der optimal ausgerichtete Bereich erweitert. Es binden hier die Trinukleotide C-C-C mit $K_{CCC} = 12\,800\text{ M}^{-1}$ und U-U-U mit $K_{UUU} = 4\,800\text{ M}^{-1}$, also deutlich höher als in der freien 5S RNS.

In der C-Region tritt eine Verschiebung der Bindungsorte von Pos. Nr. 26 - 30 nach Pos. Nr. 29 - 32 im Komplex auf. Hier bindet das Tetramer A-C-G-G mit $K_{ACGG} = 81\,000\text{ M}^{-1}$ gegenüber $K_{ACGG} = 0\text{ M}^{-1}$ in der proteinfreien 5S RNS. Sehr auffällig ist die Erhöhung der Bindungskonstanten der Tetranukleotide, die am Anfang der D-Region binden. Es

erhöhen sich die Bindungskonstanten von $K_{\text{UCGG}} = 8\,000\text{ M}^{-1}$ bei der freien 5S RNS auf $K_{\text{UCGG}} = 14\,600\text{ M}^{-1}$ Komplex, und $K_{\text{UUCG}} = 3\,000\text{ M}^{-1}$ bei der freien 5S RNS auf $K_{\text{UUCG}} = 135\,000\text{ M}^{-1}$ im 5S RNS-Protein-Komplex. Beim ersten Tetramer erhöht sich der α -Wert von $\alpha = 2$ auf $\alpha = 2,2$ und beim zweiten von $\alpha = 2$ auf $\alpha = 11,2$. Im Bereich um Pos. Nr. 60 bindet im Komplex das Oligonukleotid A-G-A-G mit $K_{\text{AGAG}} = 30\,000\text{ M}^{-1}$ und einen α -Wert von 2,1, während in der freien 5S RNS dieses Tetramer mit $K_{\text{AGAG}} = 30\,000\text{ M}^{-1}$ und $\alpha = 4$ stärker bindet.

In der G-Region treten zwei neue Bindungsbereiche, Pos. Nr. 97 - 100 und 104 - 107 auf. Es binden die beiden Trinukleotide C-U-U und U-U-G mit $K_{\text{CUU}} = 10\,000\text{ M}^{-1}$ und $K_{\text{UUG}} = 5\,300\text{ M}^{-1}$. Am 3'-Ende bindet das Tetramer A-C-C-U mit $K_{\text{ACCU}} = 17\,500\text{ M}^{-1}$ und $\alpha = 4$, so daß in der G-Region zwei neue Bindungsbereiche nach Anlagerung der Proteine aufgetreten sind, während ein Bindungsbereich verschwunden ist.

3.5. Untersuchungen mit Oligonukleotiden am 5S RNS-Protein-Komplex von Bac.stearothermophilus in Gegenwart von GTP

3.5.1. Untersuchungen in der Gleichgewichtsdialyse

Um Konformationsänderungen in der 5S RNS von Bac.stearothermophilus nicht nur durch die Anlagerung der Bindungsproteine, sondern auch durch deren enzymatische Aktivität zu ermitteln, wurde der 5S RNS-Protein-Komplex in Gegenwart von GTP mit Oligonukleotiden untersucht. Zunächst wurde zu $7\mu\text{M}$ 5S RNS-Protein-Komplex $11,9\text{ mM}$ GTP hinzugegeben, dies Gemisch 30 Min. bei 60°C inkubiert und schnell auf 0°C abgekühlt. Nach der dreitägigen Gleichgewichtsdialyse stellte sich heraus, daß die Dialysemembranen durch ein Präzipitat blockiert waren. Das Präzipitat ist das un-

lösliche $(\text{Mg NH}_2) \text{PO}_4$ (vgl. Abschnitt 3.3.4.1.). Um eine Präzipitatbildung zu verhindern, wurde die GTP-Konzentration auf 0,04mM pro 1 A_{260} 5S RNS-Komplex herabgesetzt. Dies entspricht einem Faktor von 43. Die Tab. 5 zeigt die Bindungskonstanten von drei Trinukleotiden in Abhängigkeit von der GTP-Konzentration. Bei diesen GTP-Konzentrationen trat keine Präzipitatbildung auf.

Tab. 5 Bindungsdaten von Trinukleotiden am 5S RNS-Protein-Komplex von Bac-stearothermophilus bei verschiedenen GTP-Konzentrationen

(5S RNS-Protein-Komplex = 7 A_{260}/ml = 8 μM)

Trinukl.	μM GTP-Konz.	K (M^{-1})
A-G-G	84,5	190 125
"	169,0	155 750
"	338,0	296 875
"	678,0	187 500
U-A-G	84,5	69 250
"	169,0	84 250
"	338,0	99 500
"	767,0	46 250
A-C-C	84,5	16 200
"	169,0	26 125
"	338,0	18 335
"	676,0	15 750

Auffällig an den in Tab. 5 aufgeführten Daten sind die ungewöhnlich hohen Bindungskonstanten für Trinukleotide. Ein Maximum der Bindungskonstanten kann zwischen 169 - 338 μM GTP festgestellt werden. Die hohen Bindungskonstanten lassen darauf schließen, daß es sich bei dieser Art von Bindung nicht um die übliche Watson-Crick Basen-

paarung handelt. Es sind 54 weitere verschiedene Trinukleotide bzw. Tetramere unter enzymatischen Aktivitätsbedingungen gemessen worden. Es stellte sich heraus, daß alle Trinukleotide gebunden haben, zum Teil mit sehr hohen Bindungskonstanten. Die Tetranukleotide hatten sehr geringe Bindungskonstanten.

Zur weiteren Untersuchung dieser Beobachtung wurde ein anderer Versuch durchgeführt, der unter 3.5.2. beschrieben ist.

3.5.2. Untersuchung der Oligonukleotidbindung am 5S RNS-Protein-Komplex von Bac.stearothermophilus in Gegenwart von GTP auf Zellulose-Dünnschichtplatten

Zur Untersuchung, ob es sich bei den hohen Bindungskonstanten am 5S RNS-Protein-Komplex in Gegenwart von GTP um ein Artefakt handelt, wurde eine andere Nachweismethode für die Bindung gewählt. Es wurden folgende Proben inkubiert:

(5S RNS)^B : 7 A₂₆₀ /ml GTP : 3,2 mM

1. (5S RNS)^B (10µl) + GTP (1µl) + CGG⁺ (5µl) bei 40°C 30 Min. inkubiert, dann 48 Std. bei 0°C inkubiert.
2. (5S RNS)^B (10µl) + GTP (1µl) + CGG⁺ (5µl) bei 60°C 30 Min. inkubiert, dann 48 Std. bei 0°C inkubiert.
3. C - G - G⁺ 5µl $\hat{=}$ 5 000 cpm
4. CpG 2 µl (1mM/ml)
5. GTP 1 µl 3,2mM GTP

Diese 5 Proben werden auf eine Dünnschicht-Zelluloseplatte mit Fluoreszenz-Indikator (s. Abschnitt 2.2.3.) mit einer feinen Kapillare aufgetragen, so daß der Fleck einen Durchmesser von weniger als 4 mm hatte.

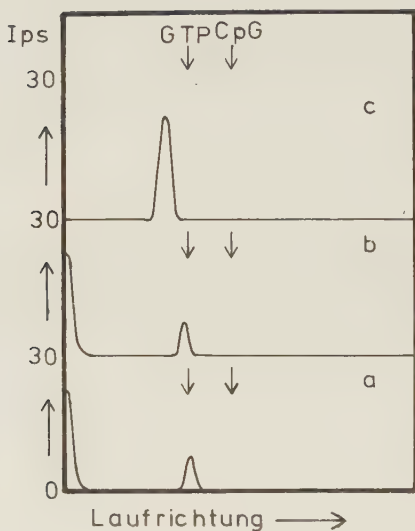


Abb. 9 Cellulose Dünnschicht-Chromatogramm von Bac.stearo-
termophilus von Bac.stearothermophilus 5S RNS-Pro-
tein-Komplex, CpGpG und GTP

a : 5S RNS-Protein-Komplex, GTP, CpGpG
Inkubation: 30 Min. bei 40°C

b : 5S RNS-Protein-Komplex, GTP, CpGpG
Inkubation: 30 Min. bei 60°C

c : CpGpG (5 000 Ipm)

Fließmittel 50 : 50 NH₄Ac/Äthanol

Das Chromatogramm wurde 3 Std. in 40 : 60 NH_4AC /Äthanol entwickelt und anschließend getrocknet. Das radioaktive C-G-G^+ blieb zum größten Teil (75 %) am Start liegen, sowohl bei Probe 1 als auch Probe 2. Bei beiden lief das restliche C-G-G^+ identisch mit der Kontrolle Nr. 3. Unter kurzzeitigem UV-Licht konnte man das GTP in einem länglichen Fleck erkennen, was sicherlich auf das Vorhandensein von GDP zurückzuführen ist.

Hier sind die einzelnen R_F -Werte aufgeführt.

1. C-G-G	$R_{F1} = 0$,	$R_{F2} = 0,293$	GTP	$R_F = 0,366$
2. C-G-G	$R_{F1} = 0$,	$R_{F2} = 0,293$	GTP	$R_F = 0,366$
3. C-G-G		$R_F = 0,293$		
4. CpG		$R_F = 0,47$		
5. GTP		$R_F = 0,34$		

siehe Abb. 9

Aus diesem Versuch kann gefolgert werden, daß die in der Gleichgewichtsdealyse gemessenen hohen Bindungskonstanten nicht auf eine Blockierung der Dialysemembran zurückzuführen sind, da durch diesen Versuch gezeigt wurde, daß die Trinukleotide ebenfalls am RNS-Protein-Komplex gebunden haben. Um zu entscheiden, ob die Oligonukleotide vom 5S RNS-Protein-Komplex in Gegenwart von GTP polymerisiert werden, wurde mit $\alpha^{32}\text{P-GTP}$ der gleiche Versuch durchgeführt. Die Analyse auf der Dünnschichtplatte zeigte, daß kein $\alpha^{32}\text{P-GTP}$ als Substrat für RNS-Polymerisierung umgesetzt wurde. Es blieb keine ^{32}P -Radioaktivität am Start liegen, sondern sie hatte denselben R_F -Wert wie die GDP- und GTP-Kontrolle. Dies bedeutet, daß durch die enzymatische Hydrolyse Proteine an der Oligonukleotidbindung beteiligt sind. Dafür spricht auch, daß praktisch alle Trinukleotide unter diesen Bedingungen am 5S RNS-Protein-Komplex binden.

3.6. Vergleich der Bindungsdaten der Oligonukleotide an der 5S RNS und am 5S RNS-Protein-Komplex von E.coli und Bac.stearothermophilus

3.6.1. Vergleich der Bindungsdaten der Oligonukleotide an der freien 5S RNS von E.coli und Bac.stearothermophilus

Betrachtet man die Abb. 5 und 7, so fallen einem drei nahezu identische Bindungsbereiche bei E.coli und Bac.stearothermophilus 5S RNS auf.

Der erste Bindungsbereich erstreckt sich bei E.coli von Pos. Nr. 25 - 32, enthält also drei Nukleotide der B-Region und die konservierte C-A-C-C-Sequenz. Bei Bac.stearothermophilus wird allerdings nur die C-A-C-C-Sequenz umfaßt. Das Tetramer G-G-U-G bindet bei E.coli mit $K_{GGUG} = 18\ 000\ M^{-1}$, während es bei Bac.stearothermophilus mit $K_{GGUG} = 135\ 000\ M^{-1}$ in Wechselwirkung tritt. Die a-Werte zeigen an, daß es sich bei E.coli um eine mittlere Bindung, $a = 2,2$ und bei Bac.stearothermophilus um eine starke Bindung $a > 5$ handelt.

Der zweite gleiche Bindungsbereich befindet sich in der D-Region zwischen Pos. Nr. 58 - 64 (E.coli) bzw. 56 - 61 (Bac.stearothermophilus). In diesem Bindungsbereich befinden sich zwei konservierte Neukleotide, während die anderen variabel sind.

Der dritte Bindungsbereich erstreckt sich von Pos. Nr. 67 - 72 (E.coli) bzw. 65 - 71 (Bac.stearothermophilus). Dieser Bereich schließt die stark konservierte Sequenz C-G-C-C ein. Bei beiden 5S RNS ist in diesem Fall vor dem 5'C noch ein G, was aber bei anderen prokaryontischen 5S RNS ausgetauscht sein kann. Das Tetramer G-C-G-C bindet mit $K_{GCGC} = 47\ 000\ M^{-1}$ (E.coli) und $K_{GCGC} = 70\ 900\ M^{-1}$ (Bac.stearothermophilus). Bei E.coli handelt es sich um den oberen Wert einer mittleren Bindung, während bei Bac.stearothermophilus eine starke Bindung festzustellen

ist. Auffällig beim Vergleich der nahezu identischen Regionen sind die allgemein geringeren Bindungskonstanten bei der E.coli 5S RNS gegenüber der bei Bac.stearothermophilus.

Bei E.coli bindet in der C-Region, im Gegensatz zu Bac.stearothermophilus, das Tetramer A-U-G-G mit $K_{AUGG} = 12 \cdot 100 \text{ M}^{-1}$, allerdings ist der α -Wert 2,4. In der B-Region ist bei E.coli noch eine Bindung möglich, da dort ebenfalls die Sequenz G-C-G-C auftritt, während bei der Bac.stearothermophilus 5S RNS der Anfang der B-Region mit dem Tetramer U-A-G-C zu gänglich ist.

In der F-Region scheint bei beiden 5S RNS eine Bindung möglich zu sein. Bei E.coli könnten die beiden Trinukleotide G-G-A und G-A-G in der F-Region, dem "hairpin loop", binden, während bei Bac.stearothermophilus das Tetramer G-C-G-C dort binden könnte. In der G-Region ist bei E.coli ein Bindungsbereich bei Pos. Nr. 96 - 99 zu finden, während bei Bac.stearothermophilus das Tetramer C-A-G-G im Übergang von der G-Region zur E'-Region ganz schwach bindet, da $\alpha = 1,9$.

Zusammenfassung: In der 5S RNS E.coli gibt es drei mit der 5S RNS von Bac.stearothermophilus nahezu identische Bindungsbereiche für Oligonukleotide, wovon eine in der C-Region und die anderen beiden in der D-Region liegen. Bei E.coli existieren noch drei weiteren Bindungsbereiche.

3.6.2. Vergleich der Bindungsdaten der Oligonukleotide am 5S RNS-Protein-Komplex von E.coli und Bac.stearothermophilus

Die 5S RNS-Protein-Komplexe von E.coli und Bac.stearothermophilus unterscheiden sich in ihrer Proteinzusammensetzung und in der Ausdehnung ihrer Bindungsbereiche. Beim E.coli 5S RNS-Protein-Komplex binden die drei Proteine E-L5, E-L18 und E-L25, das Protein E-L5 bindet nicht sehr

stark. Die Bindungsbereiche der Proteine erstrecken sich von Pos. Nr. 24 - 102 und Pos. Nr. 107 - 116.

Beim Bac.stearothermophilus 5S RNS-Protein-Komplex, der allerdings auf eine andere Weise dargestellt worden ist (siehe Abschnitt 2.4.3.), binden die ribosomalen Proteine B-L5 und B-L22. Das Protein B-L22 läßt sich aufgrund seines elektrophoretischen Verhaltens mit E-L18 korrelieren. Die Bindungsbereiche dieser beiden Proteine erstrecken sich von Pos. Nr. 20 - 98. Das stöchiometrische Verhältnis sowohl der Proteine untereinander als auch zur RNS ist noch nicht genau untersucht.

Die beiden 5S RNS-Protein-Komplexe zeigen eine Übereinstimmung in der Oligonukleotidbindung im Bereich der konservierten C-C-G-A-A-C-Sequenz (vgl. Abb 6 und 8) am Anfang der D-Region. Diese erstreckt sich bei E.coli von Pos. Nr. 42 - 47 und bei Bac.stearothermophilus von Pos. Nr. 40 - 45. Diese Sequenz kommt bei allen prokaryontischen 5S RNS in der gleichen Position, nämlich am Anfang der D-Region vor. Das Tetramer U-U-C-G bindet bei E.coli schwach ($a = 2$), während es bei Bac.stearothermophilus mit $a = 11$ eine starke Bindung eingeht. Bei E.coli erstreckt sich der Bindungsbereich über sechs Nukleotide, während er bei Bac.stearothermophilus um ein Nukleotid kürzer ist.

In der A'-Region gibt es beim Bac.stearothermophilus 5S RNS-Protein-Komplex eine Wechselwirkung mit einem Tetramer, während beim E.coli 5S RNS-Protein-Komplex in der A-A'-Region keine Wechselwirkung stattfindet. In der B-Region gibt es sowohl beim E.coli als auch Bac.stearothermophilus RNS-Protein-Komplex zwei zugängliche Bereiche, nämlich Pos. Nr. 11 - 14 und 17 - 20 bei E.coli und Pos. Nr. 18 - 25 bei Bac.stearothermophilus. Es handelt sich also jeweils um zwei verschiedene Bereiche.

In der C-Region ist nur bei Bac.stearothermophilus eine Wechselwirkung festzustellen.

In der D-Region existieren bei beiden Komplexen neben dem erwähnten C-C-G-A-A-C-Bereich noch zwei andere Bereiche, die bei E.coli zu einem Bereich zusammengefaßt sind, nämlich Pos. Nr. 62- 75 bei E.coli. Hier bindet das Tetramer A-C-G-G mit $K_{ACGG} = 75\ 000\ M^{-1}$ und $a = 5,5$ und Pos. Nr. 67 - 73 mit $K_{GCGC} = 20\ 000\ M^{-1}$ $a = 4,5$ und U-C-G-G mit $K_{UCGG} = 31\ 000\ M^{-1}$, $a = 2$. Beim Bac.stearothermophilus Komplex erstrecken sich die Bereiche von Pos. Nr. 58 - 61 und 70 - 73. Im ersten Bereich bindet A-G-A-G mit $K_{AGAG} = 30\ 000\ M^{-1}$ $a = 2,2$ und A-U-C-G mit $K_{AUCG} = 100\ 000\ M^{-1}$, $a = 12$, Pos. Nr. 70 - 73. Bei den Bindungsbereichen um Pos. Nr. 60 handelt es sich bei beiden 5S RNS-Protein-Komplexen um den variablen Teil der D-Region.

Auffällig beim E.coli 5S RNS-Protein-Komplex ist die Bindung in der F-Region. Diese Region ist bei Bac.stearothermophilus überhaupt nicht zugänglich. Dafür ist in der G-Region genau das Umgekehrte der Fall, denn hier findet sich bei E.coli kein Bindungsbereich, während bei Bac.stearothermophilus die Pos. Nr. 97 - 100 und 104 - 107 zugänglich sind.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die C-G-A-A-C-Sequenz der 5S RNS bei beiden Komplexen für eine Basenpaarung zugänglich ist. Ferner ist der variable Teil um Pos. Nr. 60 in der D-Region für eine Basenpaarung ausgerichtet. Die anderen Bindungsbereiche sind voneinander verschieden.

3.7. Vergleich der Bindungsdaten am 5S RNS-Protein-Komplex von E.coli und Bac.stearothermophilus in Gegenwart von GTP

Die beiden 5S RNS-Protein-Komplexe unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Strukturveränderung während der enzymatischen Aktivitäten beträchtlich. Beim E.coli 5S RNS-Pro-

tein-Komplex zeigte sich, daß nur ein Tetranukleotid, nämlich A-C-G-G, bindet, mit einem $K_{ACGG} = 81\,000\,M^{-1}$. Im C-C-G-A-A-C-Bereich, am Anfang der D-Region, bindet das Tetramer U-U-C-G nicht. Es kann noch nicht gesagt werden, warum die RNS bis auf zwei Ausnahmen nicht für eine Basenpaarung zugänglich ist. Die F-Region ist mit Trinukleotiden zugänglich.

Beim 5S RNS-Protein-Komplex von Bac.stearothermophilus ist das Umgekehrte der Fall. Hier binden alle Oligonukleotide mit außerordentlich hohen Bindungskonstanten. Diese hohen Bindungskonstanten lassen sich nicht auf eine Watson Crick-Basenpaarung zurückführen; wahrscheinlicher auf eine unspezifische Bindung der Oligonukleotide mit den Proteinen oder nur mit einem Protein, vielleicht B-L5. Eine Polymerisation der Oligonukleotide ist auszuschließen, da nach Zugabe von $\alpha^{32}P$ -GTP kein Einbau des Guanins in das Dinukleosidmonophosphat bzw. Trinukleotid erfolgte.

3.8. Bindungsversuch mit E.coli ribosomalen Proteinen an 5S RNS und 5,8S RNS aus Hefe (Saccharomyces cerevisiae)

Vergleicht man die Sequenz der 5S RNS von Eukaryonten mit der 5S RNS aus Prokaryonten, so zeigt sich ein großer Unterschied. Diese beiden 5S RNS bilden zwei deutlich zu unterscheidende Klassen. Dies konnte durch Rekontitutionsversuche ebenfalls bestätigt werden (WREDE und ERDMANN, 1973; ERDMANN, 1976).

Zieht man allerdings die ebenfalls in der großen ribosomalen Untereinheit in Eukaryonten vorkommende 5,8S RNS zum Vergleich heran, so zeigt sich eine größere Homologie zur prokaryontischen 5S RNS (RUBIN, 1973; ERDMANN, 1976). Diese 5,8S RNS enthält mehrere G-A-A-C bzw. G-A-A-U-Sequenzen, aber eine befindet sich 46 Nukleotide von der U-G-G-Sequenz entfernt, was bei der Prokaryonten 5S RNS auch der Fall ist. Wie aus der Abb. 10 zu ersehen ist, läßt sich die 5,8S RNS in ein der 5S RNS ähnliches Schema bringen (ERDMANN, 1976).

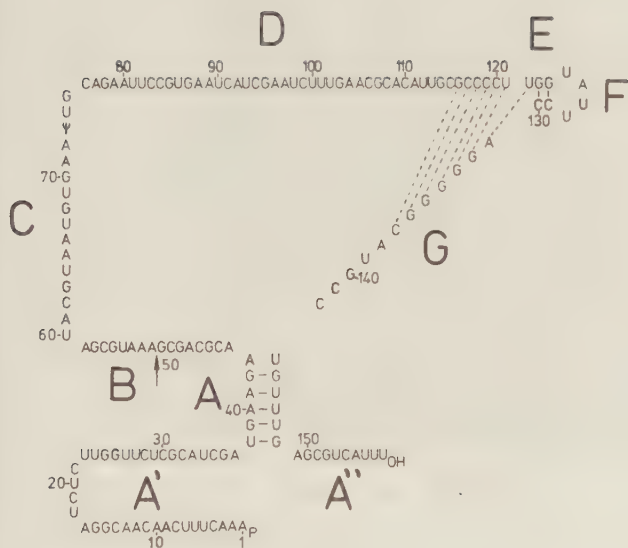


Abb. 10 Primärstruktur von 5,8S RNS von Hefe

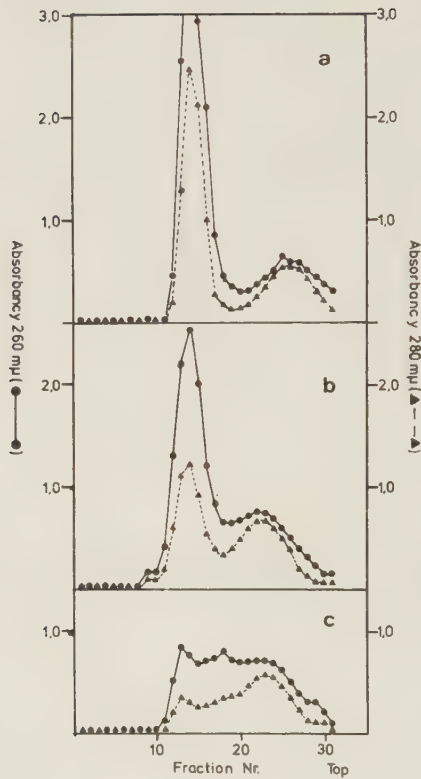


Abb. 11 Gradientenprofile von E.coli UTP 50 mit verschiedenen rRNS

a : UTP 50 von E.coli, inkubiert mit 5 S RNS
E.coli

b : UTP 50 von E.coli, inkubiert mit 5S RNS Hefe

c : UTP 50 von E.coli, inkubiert mit 5,8S RNS Hefe



Abb. 12 Zweidimensionale Gel-Elektrophorese von
ribosomalen Proteinen der großen Unter-
einheit von E.coli

Rekonstituierter E.coli Protein-5,8S RNS-Hefe-
Komplex

Um nun diese Sequenzstudie auf ihre biologische Bedeutung hin zu prüfen, wurde diese 5,8S RNS aus Hefe mit den totalen RNS-freien E.coli 50S Proteinen inkubiert (s. 2.4.2.) und dieses Inkubationsgemisch in dem dort beschriebenen SW-27-Saccharose Gradienten unter den gleichen Bedingungen aufgetrennt. Als Kontrolle dienten die homologe 5S RNS E.coli und 5S RNS Hefe, die unter den gleichen Bedingungen mit den totalen 50S E.coli Proteinen inkubiert und aufgetrennt wurden. Die Gradientenbilder sind in Abb. 11 a - c gezeigt. Auffällig ist, daß bei dem 5,8S-Proteinkomplex drei Absorptionsmaxima bei 260nm auftreten, wobei beim ersten Maximum die Absorption bei 260 nm doppelt so hoch gegenüber der Absorption bei 280nm ist (Abb. 11 c). Dies bedeutet, daß es sich hier vorwiegend um RNS handelt, während beim dritten Maximum die beiden Absorptionskurven von 260nm und 280nm etwa gleich hoch liegen. Warum das mittlere Absorptionsmaximum auftritt, ist Gegenstand gegenwärtiger Versuche. Extrahiert man die Proteine (KALTSCHMIDT und WITTMANN, 1970) aus dem der drei Maxima zugehörigen Material und testet sie in der zweidimensionalen Gelelektrophorese, so zeigt sich beim ersten Maximum, daß die Proteine E-L18 und E-L25 gebunden haben (Abb. 12). Beim zweiten Maximum finden sich zusätzlich die Proteine E-L7/12 und E-L2, während am Start des Gradienten, also zum dritten Maximum gehörig, sich alle E.coli 50S Proteine befinden.

Die Abb. 11 b zeigt das Gradientenbild 5S RNS Hefe mit den E.coli 50S Proteinen. Es gibt zwei Absorptionsmaxima bei 260nm, das erste tritt bei Fraktion Nr. 14 und das zweite bei Fraktion Nr. 22, also am Start des Gradienten, auf. Werden die jeweils zu den entsprechenden Maxima zugehörigen Proteine extrahiert, so zeigt sich, daß die 5S RNS Hefe keine Proteine gebunden hat. Das andere Maximum enthält alle Proteine von 50S E.coli.

In Abb. 11 a ist das Gradientenbild der 5S RNS E.coli mit den homologen Proteinen gezeigt. Dieser 5S RNS-Protein-Komplex enthält, wie schon erwähnt, die Proteine E-L18 und E-L25 und in geringer Menge E-L5, E-L7/12, E-L27 und E-L30 (Abb. 4). (Die genaue Versuchsbeschreibung ist in WREDE und ERDMANN, 1976 in Vorbereitung.)

Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, daß die eukaryontische 5,8S RNS aus Hefe mit der prokaryontischen 5S RNS strukturell verwandt ist. Es ist sehr erstaunlich, daß von der 5,8S RNS ebenfalls die 5S RNS-Bindungsproteine E-L18 und E-L25 erkannt und gebunden werden können. Die enzymatische Aktivität von 5,8S RNS-Protein-Komplex konnte noch nicht gemessen werden. Wenn man berücksichtigt, daß diese beiden Proteine zusammen mit der prokaryontischen 5S RNS enzymatische Aktivitäten (Hydrolyse von GTP und ATP) besitzen, so zeigen gerade diese Proteine eine wichtige funktionale Bedeutung im Ribosom.

Es ist also sowohl im pro- als auch im eukaryontischen Ribosom eine entscheidende Struktur, wahrscheinlich in der D-Region der RNS erhalten geblieben. Wahrscheinlich ist die eukaryontische 5S RNS für die Initiation wichtig. Am Anfang der D-Region der eukaryontischen 5S RNS befindet sich die Sequenz G-A-U, die komplementär zur Schleife IV der eukaryontischen Initiator-tRNS ist, während die 5,8S RNS wohl für die Wechselwirkung mit der Aminoacyl-tRNS, die in Schleife IV die stark konservierte G-T-Y-C-Sequenz enthält, verantwortlich ist. (ERDMANN, 1976)

4. Diskussion der Ergebnisse

4.1. Vergleich der freien 5S RNS von E.coli und Bac.stearothermophilus

4.1.1. Vergleich der Bindungsdaten an der freien 5S RNS von E.coli mit Literaturwerten

Die Methode der Oligonukleotidbindung zur Vermessung von RNS-Makromolekülen ist zuerst für die 5S RNS E.coli und für das Antikodon der $\text{tRNA}_{\text{F}}^{\text{Met}}$ E.coli benutzt worden. Die 5S RNS wurde von LEWIS und DOTY (1970) vermessen. Es sollen ihre Daten mit denen in dieser Arbeit aufgeführten verglichen werden (s. Abb. 5). Die beiden Messungen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Pufferbedingungen in der Gleichgewichtsdialyse. LEWIS und DOTY benutzten einen NaCl-Puffer folgender Zusammensetzung 10mM Na_2HPO_4 , 10mM MgCl_2 , 1,0 M NaCl; während in dieser Arbeit der Rekonstitutionspuffer benutzt wurde: 30mM Tris-HCl pH 7,4, 20mM MgCl_2 , 320mM KCl, 6mM β -Mercaptoäthanol. Im NaCl-Puffer gibt es bei der 5S RNS vier Bindungsbereiche: Pos. Nr. 9 - 13 (A-B-Region), 25 - 32 (B-C-Region), 58 - 65 (D-Region) und 95 - 98 (G-Region), während im KCl-Puffer folgende Bereiche gefunden wurden: 16 - 20 (B-Region), 25 - 32 (B-C-Region), 33 - 40 (C-Region), 58 - 64 (D-Region), 67 - 72 (D-Region), 88 - 91 (F- E'-Region) und 96 - 99 (G-Region). Ein Vergleich mit 5S RNS aus E.coli und fünf verschiedenen Trinukleotiden ergab, daß sowohl im NaCl- als auch KCl-Puffer die gleichen Bindungskonstanten erreicht wurden.

Beim Vergleich der Ergebnisse aus den beiden Arbeiten fällt sofort der übereinstimmende Bindungsbereich im Übergang von der B- zur C-Region, also Pos. Nr. 25 - 32, auf. Die Bindungskonstanten liegen in diesem Bereich in der gleichen Größenordnung wie im KCl-Puffer (s. Abb. 5).

In der C-Region bindet im Rekonstitutionspuffer das Tetramer A-U-G-G Pos. Nr. 37 - 40 mit $K_{AUGG} = 12\ 000\ M^{-1}$, während im NaCl-Puffer A-U-G-G ein K-Wert von $K_{AUGG} = 4\ 000\ M^{-1}$ besitzt und als "nicht bindend" charakterisiert wird.

Der Bindungsbereich in der D-Region von Pos. Nr. 58 - 65 ist im NaCl-Puffer zugänglich. Im Rekonstitutionspuffer ist dieser Bereich um ein Nukleotid kürzer, also von Pos. Nr. 58 - 64.

In der Arbeit von LEWIS und DOTY ist die Messung mit dem Tetramer A-C-G-G zwar in der Abbildung angegeben, es wird aber keine Bindungskonstante genannt. Die dazu komplementäre 5S RNS-Sequenz tritt nämlich auch in der B-Region (Pos. Nr. 11 - 14) auf, ohne daß dieser Bereich unterstrichen wäre. Im Rekonstitutionspuffer ist die Bindungskonstante $K_{ACGG} = 1\ 000\ M^{-1}$; das Tetranukleotid bindet also nicht.

Von LEWIS und DOTY (1970) ist die 5S RNS nicht mit dem Tetramer G-C-G-C vermessen worden. Die dem Tetramer komplementäre 5S RNS-Sequenz erstreckt sich in der D-Region im Bereich Pos. Nr. 67 - 70. Die Bindungskonstante ist $K_{GCGC} = 47\ 000\ M^{-1}$. Die zum 3'-Ende benachbarte Sequenz C-C-G ist für eine Trinukleotidbindung höchstwahrscheinlich zugänglich, da das Tetramer U-C-G-G mit $K_{UCGG} = 15\ 000\ M^{-1}$ nur mit seiner C-G-G-Komponente in Wechselwirkung tritt. Allerdings tritt die Sequenz G-C-G-C auch in der B-Region auf, und es kann daher nicht gesagt werden, in welcher Region dieses Tetramer nun bindet.

Für den "hairpin-loop" der F-Region ist eine Bindung zwar wahrscheinlich, aber nicht sicher. Über eine Bindung im NaCl-Puffer existieren keine Angaben.

In der G-Region findet man im Rekonstitutionspuffer eine Bindungsregion (Pos. Nr. 96 - 99), die gegenüber dem NaCl-Puffer (Pos. 95 - 98) um ein Nukleotid in Richtung zum 3'-Ende hin verschoben ist (Pos. 96 - 99). Das Tetramer U-C-G-C bindet nicht im NaCl-Puffer.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß im NaCl- und Rekonstitutionspuffer die Bereiche Pos. Nr. 25 - 32, 58 - 64 und 96 - 98 für Oligonukleotidbindung zugänglich sind. Als neue Bindungsbereiche im Rekonstitutionspuffer wurden Pos. Nr. 37 - 40 und 67 - 72 oder 16 - 20 gefunden. Es ist auffallend, daß im Rekonstitutionspuffer fast alle Bindungskonstanten der Tetramere geringer sind als im NaCl-Puffer, während zum großen Teil die Bindungskonstanten der Trinukleotide in beiden Puffer übereinstimmen.

4.1.2. Vergleich der Bindungsdaten der Oligonukleotide an 5S RNS von E.coli und Bac.stearothermophilus

Der Vergleich der Bindungsdaten von E.coli und Bac. stearothermophilus ist unter 3.6.1. aufgeführt. Hier soll nun die Bedeutung des Vergleichs erklärt werden.

Aus dem Vergleich der Oligonukleotidbindung an E.coli und Bac.stearothermophilus 5S RNS geht hervor, daß zwei der drei Bindungsbereiche stark konserviert sind, nämlich die C-A-C-C-Antisequenz am Anfang der C-Region und die C-G-C-C-Antisequenz um Pos. Nr. 70 in der D-Region. Der dritte identische Bindungsbereich gehört zum variablen Teil in der D-Region um Pos. Nr. 60.

Auffällig sind die höheren Bindungskonstanten der Oligonukleotide bei Bac.stearothermophilus. Selbst bei der gleichen Nukleotidsequenz betragen die Bindungskonstanten des Tetramers G-G-U-G bei $K_{E.coli} = 18\ 000\ M^{-1}$ und bei $K_{Bac.stearo} = 100\ 000\ M^{-1}$ (bindet in der C-Region Pos. Nr. 28 - 31 E.coli und Pos. Nr. 26 - 29 Bac.stearothermophilus). Die Ursache für dieses Verhalten ist unklar. Wahrscheinlich sind im Rekonstitutionspuffer bei der Bac. stearothermophilus 5S RNS die Basen in den entsprechenden Bereichen besser für die Basenpaarung ausgerichtet. Ferner kann bei Bac.stearothermophilus die purinreiche B-Region die Bindungskonstante von G-G-U-G in der C-Re-

gion erhöhen. Im allgemeinen sind die Purine für die Basenpaarung besser ausgerichtet.

Da bei Bac.stearothermophilus und E.coli 5S RNS die gleichen Bereiche für die Oligonukleotidbindung zugänglich sind, kann man sagen, daß die Tertiärstruktur bei beiden sehr ähnlich ist. Diese Bereiche sind wahrscheinlich für die Proteinerkennung und -bindung wichtig.

4.2. Vergleich der Bindungsdaten mit enzymatischen Spaltungen und chemischen Modifizierungen an der 5S RNS E.coli

Als eine andere Methode zur Erfassung von einzelsträngigen Bereichen sind enzymatische Spaltungen mit Nukleasen und chemische Modifizierungen benutzt worden.

Bei der 5S RNS E.coli ist die Pos. Nr. G41 sehr leicht für einen enzymatischen Zugriff mit T1 ausgerichtet. Die Pos. Nr. G44 ist sehr leicht mit RNase IV zugänglich. Dies bedeutet, daß die Zugänglichkeit für die RNasespaltung nicht nur vom Substrat abhängig ist, sondern auch von der benutzten RNase. Schafsnieren RNase spaltet die 5S RNS E.coli bei Pos. Nr. A34 und A50 (BELLEMARE et al., 1972). Es gibt allerdings eine andere Arbeit (MIRZABEKOV und GRIFFIN, 1972), nach der RNase T1 und G61 und nicht G41 spaltet. Weitere sekundäre Spaltungen wurden nach G16, G18, G56, G100 und G102 gefunden. Mit RNase C geschieht die erste Hydrolyse in der Bac.stearothermophilus 5S RNS bei U12 und bei C45 (ERDMANN, 1976). Vergleicht man die primären RNase-Spaltungen, so liegen alle Spaltungen außerhalb der Oligonukleotidbindungsbereiche. Dies ist sowohl bei E.coli als auch bei Bac.stearothermophilus (Abb. 5 und 7) der Fall.

Chemische Modifizierungen mit basenspezifischen Reagenzien sind mit dem Ziel durchgeführt worden, Basen im Einzel-

strangbereich zu treffen. So reagieren Glyoxal und Kethoxal mit Guanin. In der E.coli 5S RNS ist G41 am empfindlichsten gegenüber diesen Reagenzien (BELLEMARE et al., 1972a; AUBERT et al., 1973). Etwas weniger empfindlich sind die Basen G13 und G44. Beim Reagenz Methoxyamin, welches cytosinspezifisch ist, reagieren die Cytosine zwischen Pos. Nr. 34 - 41, 44 - 51 und höchstwahrscheinlich C88. Die chemischen Modifizierungen liegen bei den sehr spezifischen Reagenzien außerhalb nämlich G41, G13 und G44 der Bindungsbereiche für Oligonukleotide.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß innerhalb der Oligonukleotidbindungsgebiete keine Orte für eine chemische Modifizierung oder enzymatischen Zugriff liegen. Vielleicht ist für die Zugänglichkeit der chemischen Reagenzien bzw. RNasen eine andere Konformation der Basen notwendig als für die Oligonukleotidbindung, die nicht nur einen Einzelstrang, sondern auch eine optimale Basenausrichtung zueinander, "base stacking", benötigt. Ferner werden bei den chemischen Modifizierungen nur einzelne Basen und nicht ganze Abschnitte getroffen.

4.3. Vergleich der Oligonukleotidbindungsgebiete mit vorgeschlagenen 5S RNS-Modellen

Die meisten 5S RNS-Modelle stammen von E.coli; sie basieren auf verschiedenen Untersuchungen physikalischer Art und auf Evolutionsstudien.

Es konnte durch NMR-Messungen eine bestimmte Sekundärstruktur vorgeschlagen werden (KEARNS und WONG, 1974) (vgl. Abb. 13). Die NMR-Methode hat den Vorteil, daß einzelne Basenpaare und der Gesamtanteil der Doppelhelixform innerhalb geringer Schwankungen bestimmt werden kann. Die Oligonukleotidbindungsgebiete befinden sich nach diesem Modell nur zum Teil im Einzelstrangbereich, während Pos. Nr. 16 - 20, 37 - 40 und 67 - 70 im Doppelstrangbe-

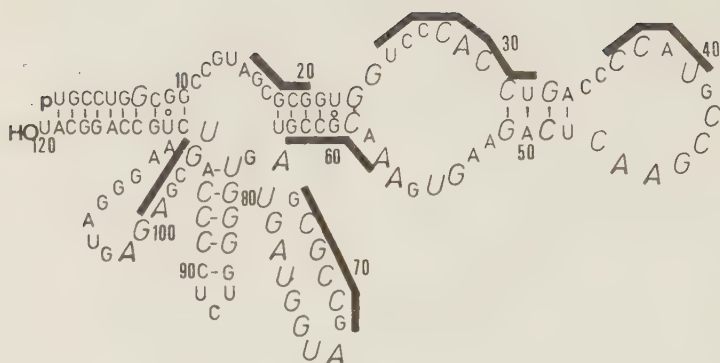


Abb. 14 Vergleich der Oligonukleotidbindungsbereiche
mit dem Evolutions-5S RNS-Modell von
FOX und WOESE (1975)

reich liegen sollen. Daher kann gesagt werden, daß dieses 5S RNS-Modell nicht mit den Oligonukleotidbindungsdaten übereinstimmt.

Aus dem Sequenzvergleich der 5S RNS von verschiedenen Organismen folgt, daß sich jeweils ungefähr 10 Nukleotide des 5'-Endes und 3'-Endes basenpaaren lassen. Evolutionsstudien konnten zeigen, daß alle prokaryontischen 5S RNS einen hohen Grad an Homologie aufweisen (ERDMANN, 1976; FOX und WOESE, 1975). FOX und WOESE (1975) haben ein Modell vorgeschlagen, nach dem in der 5S RNS E.coli Pos. Nr. 1 - 10, 19 - 23, 31 - 34, 48 - 51, 60 - 64, 82 - 86, 90 - 94 und 110 - 120 basengepaart ist. Wie aus der Abb. 14 zu ersehen ist, befindet sich ein Bindungsbereich für Oligonukleotide (Pos. Nr. 58 - 64) nahezu vollständig im Doppelhelixbereich. Ferner ist der Bereich von Pos. Nr. 92 - 95 für eine Tetramerbindung zugänglich, während er im Modell als basengepaarter Bereich dargestellt ist. Die in dieser Arbeit aufgestellte Behauptung, daß bei der Messung mit Oligonukleotiden die 5S RNS denaturiert sei, weil die Bindungsdaten dem Modell widersprechen, kann nicht aufrecht erhalten werden, da einmal die 5S RNS unter Rekonstitutionsbedingungen gemessen wurde und weil zum anderen der Vergleich mit der Bac.stearothermophilus drei im wesentlichen identische Bereiche aufweist.

4.4. Bedeutung der Bindungsdaten am 5S RNS-Protein-Komplex

4.4.1. Vergleich der Bindungsdaten mit Literaturwerten

Es gibt in der Literatur nur eine Arbeit, in der Bindungsdaten von komplementären Oligonukleotiden am 5S RNS-Protein-Komplex beschrieben werden (ERDMANN et al., 1973). In dieser Arbeit wird eine funktionelle Bedeutung der 5S RNS im Ribosom vorgeschlagen. Die 5S RNS soll mit ihrer

stark konservierten C-G-A-A-C-Sequenz in der D-Region mit der in jeder prokaryontischen tRNS vorkommenden T-Y-C-G-Sequenz in Wechselwirkung treten. Es konnte gezeigt werden, daß ähnlich wie in dieser Arbeit beschrieben beim 5S RNS-Protein-Komplex aus E.coli das Tetramer U-U-C-G mit einem $K_{UUCG} = 22\ 000\ M^{-1}$ in Wechselwirkung tritt. Wird jedoch das Tetramer T-Y-C-G benutzt, so erhöht sich die Bindungskonstante auf $K_{TYCG} = 72\ 000\ M^{-1}$. Als Kontrolle wurde eine im E.coli 50S Ribosom mit Monoperphthalsäure zum N-1-O-Adenosin oxidierte 5S RNS benutzt (ERDMANN, 1969). Es stellte sich heraus, daß damit nur zwei Adenine modifiziert wurden. Die so modifizierte 5S RNS vermochte die entsprechenden Bindungsproteine anzulagern. In der Gleichgewichtsdialyse zeigte sich allerdings, daß die Bindungskonstanten von U-U-C-G auf $K_{UUCG} = 1\ 500\ M^{-1}$ und von T-Y-C-G auf $K_{TYCG} = 2\ 000\ M^{-1}$ reduziert wurden. Dies bedeutet, daß höchstwahrscheinlich die beiden Adenine in der C-G-A-A-C-Sequenz modifiziert worden sind. Man kann allerdings die Bindungsdaten von UpUpCpG mit TpYpCpGp nicht direkt vergleichen, da beim zweiten Tetramer am 3'-Ende noch ein Phosphat gebunden ist, über dessen Wirkung keine Aussage gemacht werden kann. Es könnte die Bindungskonstante erhöhen oder erniedrigen.

Beim Bac.stearothermophilus 5S RNS-Protein-Komplex konnte ebenfalls eine Bindung des Tetramers U-U-C-G mit $K_{UUCG} = 135\ 000\ M^{-1}$ und $a = 11,2$, also nahezu sechsmal so stark wie bei E.coli, festgestellt werden.

4.4.2. Aussagen über die Protein-RNS-Wechselwirkung

Das Problem der Protein-RNS-Wechselwirkung, d.h. die Frage, welche Strukturen und Eigenschaften der beiden Komponenten wichtig für die Erkennung und Bindung sind, ist ein viel beachtetes Problem der Molekularbiologie. Kann diese Methode der komplementären Oligonukleotidbindung hierüber einige Auskunft geben ?

Sicherlich kann diese Methode Aussagen über Konformationsänderungen der RNS aufzeigen, da ja nur diese gemessen werden. Daß tatsächlich Konformationsänderungen nach Anlagerung von Proteinen auftreten, ist gezeigt worden. Betrachtet man die Bindungsbereiche der Oligonukleotide an der 5S RNS vor und nach der Anlagerung der Proteine, so fällt auf, daß es einmal Bereiche gibt, die sich in ihrer Bindungsstärke ändern. Zum anderen treten neue Bindungsbereiche mit einer erhöhten Bindungskonstanten auf. Für einen solchen neuen Bindungsbereich, nämlich der C-G-A-A-C-Sequenz, ist eine biologische Bedeutung zu erkennen, nämlich die Wechselwirkung mit der tRNS in der ribosomalen "A-site". Betrachtet man die Bindungsbereiche für Oligonukleotide sowohl bei der freien 5S RNS als auch bei dem 5S RNS-Protein-Komplex, so befinden diese sich vorwiegend in der 5'-Hälfte des Moleküls. Bei E.coli verlagert sich der Bindungsbereich für Oligonukleotide nach Anlagerung der Proteine vom Anfang der C-Region zum Anfang der D-Region. Ähnliches ist auch bei der Bac.stearothermophilus 5S RNS festzustellen.

Diese Veränderungen können bedeuten, daß die 5S RNS durch die Proteinbindung eine neue Konformation eingeht, die durch die neuen Wasserstoffbrückenbindungen, vorwiegend wahrscheinlich zwischen Aminosäuren und Phosphatbrücken, verursacht werden. Die 5S RNS wird wahrscheinlich in ihrer Gesamtstruktur, vor allem der Sekundär- und Tertiärstruktur erhalten bleiben, aber die Ausrichtung der Basen wird durch Veränderungen der Bindungswinkel in der Phosphatbrücke verändert. Dadurch werden neue Bindungen für komplementäre Oligonukleotide möglich, während andere Bindungsbereiche verschwinden. Es fällt besonders bei der E.coli 5S RNS auf, daß nach der Proteinanlagerung drei Bindungsorte für die Oligonukleotide erhalten bleiben, nämlich in der B-Region um Pos. Nr. 20 und in der D-Region um Pos. Nr. 60 und 70. Die maßgebliche Veränderung findet zwischen diesen drei Bindungsbereichen statt, nämlich der

Übergang von der C-Region zum Anfang der D-Region. Ein ähnlicher Vorgang ist auch bei der Bac.stearothermophilus 5S RNS festzustellen. Hier ist es so, daß innerhalb der C-Region sich der Bindungsbereich in Richtung zur D-Region verschiebt, und gleichzeitig am Anfang der D-Region ein neuer Bereich auftritt, dessen biologische Bedeutung mehrmals erwähnt wurde. Durch Untersuchungen mit RNase-Abbau konnten die Bindungsbereiche für die Proteine aufgeklärt werden (ZIMMERMANN, 1975), und, wie aus den Abb. 7 und 9 ersichtlich, wird ein Großteil der 5S RNS durch die Proteine geschützt. Wider Erwarten binden im 5S RNS-Protein-Komplex in solchen Bindungsbereichen auch die komplementären Oligonukleotide. Daraus ist ersichtlich, daß die Proteinbindung nicht durch die Wechselwirkung der Basen mit den Proteinen auf der gesamten Länge des RNS-Moleküls stattfindet.

4.5. Struktur und Funktion der 5,8S RNS Hefe

Durch einen Vergleich der 5,8S RNS Primärstruktur mit der pro- und eukaryontischen 5S RNS (ERDMANN, 1976) kann gezeigt werden, daß die 5,8S RNS mehr mit der pro- als mit der eukaryontischen 5S RNS verwandt ist: Es treten viele G-A-A-C- und G-A-A-U-Sequenzen auf, von der eine wie bei der bakteriellen 5S RNS mit der tRNS in der ribosomalen "A-site" in Wechselwirkung treten könnte. So kann man ersehen, daß sich im gleichen Abstand wie bei der prokaryontischen 5S RNS von der U-G-G-Sequenz in Pos. Nr. 122 - 124, also 40 Nukleotide von der Pos. Nr. 78 - 81 eine G-A-A-U-Sequenz befindet (Abb. 10).

Die C-Region ist um ein Nukleotid länger, beträgt also 15 Nukleotide. In der D-Region sind allerdings nicht sehr viele Homologien mit der prokaryontischen 5S RNS festzustellen. Gerade deswegen ist es erstaunlich, daß die 5,8S RNS aus Hefe (Saccharomyces cerevisiae) die spe-

zifischen 5S RNS-E.coli Bindungsproteine auch zu erkennen und zu binden vermag. Hier zeigt sich, daß im Heferibosom eine Struktur erhalten geblieben ist, die sich schon im Prokaryonten als optimal erwiesen hat.

Die 5,8S RNS scheint für die ribosomale "A-site" wichtig zu sein, denn die G-A-A-U-Sequenz ist komplementär zur G-T-Y-C-Sequenz in der Schleife IV und Aminoacyl-tRNS, während die eukaryontische 5S RNS wohl für die Bindung der Initiator-tRNS, die anstatt der T-Y-C-G-Sequenz eine G-A-U-Sequenz hat, die komplementär zur 5S RNS A-U-C-Sequenz ist (vgl. Abschnitt 3.8.).

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Wechselwirkung zwischen RNS und RNS bzw. Protein und RNS spielen bei der Struktur und Funktion von Ribosomen eine hervorragende Rolle. Durch RNS-RNS-Wechselwirkungen ließ sich in der Gleichgewichtsdialyse die Konformation zweier 5S RNS-Spezies vergleichen und ebenso die Änderung der Konformation nach Anlagerung der Bindungsproteine. Ebenso konnte eine Aussage über die RNS-Protein-Wechselwirkung gewonnen werden, nämlich das die Tertiärstruktur nach Anlagerung der Proteine im wesentlichen erhalten bleibt. Zum tieferen Verständnis der 5S RNS-Konformation sollte eine eukaryontische 5S RNS, zum Beispiel aus Hefe mit dieser Methode vermessen werden. Ferner zeigt der Versuch mit der 5,8S RNS aus Hefe, daß bei diesem Molekül eine schon bei den Prokaryonten vorkommende RNS-Struktur in der Evolution erhalten geblieben ist, trotz der Höherentwicklung des Heferibosoms. So sollte der gleiche Versuch mit einer animalischen 5,8S RNS durchgeführt werden, um einen Aufschluß über die Allgemeingültigkeit dieser Aussage zu erhalten.

Interessant sind ferner noch die Verhaltensweisen der Protein-RNS-Komplexe während ihrer enzymatischen Aktivität, besonders das unterschiedliche Verhalten des Bac. stearothermophilus 5S RNS-Komplexes. Eine weitere wichtige Frage, nämlich können Oligonukleotide die RNS-Konformation verändern, sollte untersucht werden.

In dieser Arbeit konnten erstmals genaue Aussagen über die Struktur und Funktion der 5S RNS gewonnen werden.

6. Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Bac.	Bacillus
E.	Escherichia
RNS	Ribonukleinsäure
Ips	Impulse pro Sekunde
cpm	Impulse pro Minute (Counts per minute)
Upm	Umdrehungen pro Minute
g	Gravitationsbeschleunigung (9,81 Meter/sec ²)
S	Svedbergkonstante sec ⁻¹³
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
Tris	Tris-hydroxymethyl-amino-methan
A	Absorption
MW	Molekulargewicht
D	Dalton
GTP	Guanosintriphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Triplett	Trinukleosiddiphosphat
Tetramer	Tetranukleosidtriphosphat

7. Literaturverzeichnis

- Aubert, M., Bellemare, G. und Monier, R.
Selective reaction of glyoxal with guanine residues in native and denatured *Escherichia coli* 5S RNA *Biochimie* 55, 135-142, (1973)
- Bellemare, G., Jordan, B.R. und Monier, R.
Demonstration of a highly exposed region in *Escherichia coli* 5S RNA by partial hydrolysis with ribonuclease IV and sheep kidney nuclease
J. Mol. Biol. 71, 307 - 317, (1972)
- Bellemare, G., Jordan, B.R., Rocca-Serra, J. und Monier, R.
Accessibility of *Escherichia coli* 5S RNA base residues to chemical reagents. Influence of chemical alternations on the affinity of 5S RNA for the 50S subunit structure.
Biochimie 54, 1453-1466, (1972a)
- Benhanou, J. und Jordan, B.R.
Nucleotide sequence of *Drosophila melanogaster* 5S RNA: Evidence for a general 5S RNA model
FEBS Lett. 62, 146 - 149, (1976)
- Brownlee, G.G., Cartwright, E., McShane, R. und Williamson, R.
The nucleotide sequence of somatic 5S RNA from *Xenopus laevis*
FEBS Lett. 25, 13 - 20, (1972)
- Brownlee, G.G., Sanger, F. und Barrell, B.G.
The sequence of 5S RNA
J. Mol. Biol. 34, 379 - 412, (1968)
- Brownlee, G.G. und Cartwright, E.M.
The nucleotide sequence of the 5S RNA of chicken embryo fibroblasts
Nucl. Acid. Res. 2, 2279 - 2284, (1975)
- Corry, M.Y., Payne, P.J. und Dyer, J.A.
The nucleotide sequence of 5S RNA from the blue green algae *Anacystis nidulans*
FEBS Lett. 46, 63 - 66, (1974)

Dernanleau, D.A.

Theory of the measurement of weak molecular complexes

I. General considerations

J. Americ. Chem. Soc. 91, 4044 - 4049, (1969)

DuBuy, B. und Weissman, S.M.

Nucleotide Sequence of Pseudomonas fluorescens 5S RNA

J. Biol. Chem. 246, 747 - 761, (1971)

Erdmann, V.A., Fahnestock, S., Higo, K. und Nomura, M.

Role of 5S RNA in the functions of 50S ribosomal subunits.

Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.), 68, 2932 - 2936, (1971)

Erdmann, V.A., Doberer, H.G. und Sprinzl, M.

Structure and function of 5S RNA: The role of the

3'-terminus in 5S RNA function.

Mol. Gen. Genet. 114, 89 - 94, (1971a)

Erdmann, V.A., Sprinzl, M. und Pongs, O.

The involvement of 5S RNA in the binding of tRNA to ribosomes

Biochem. Biophys. Res. Comm. 54, 942 - 948, (1973)

Erdmann, V.A.

Structure and function of the 5S RNA and 5,8S RNA

Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., (1976)

Fischel, J.L. und Ebel, J.P.

Sequence studies on the 5S rRNA of Proteus vulgaris:

Comparison with the 5S RNA of E.coli

Biochimie, 57, 899 - 904, (1975)

Forget, B.G. und Weissman, S.M.

Low molecular weight RNA components from KB-cells

Nature 213, 878 - 879, (1967)

Fox, G.E. und Woese, C.R.

The architecture of 5S RNA and its relation to function

J. Mol. Evol. 6, 61 - 76, (1975)

Gaunt-Kloepfer, M. und Erdmann, V.A.

ATPase and GTPase activities associated with the 5S RNA-protein-complex of Escherichia coli ribosomes

Biochim. Biophys. Acta, 390, 226 - 230, (1975)

Hindley, J. und Page, S.M.

Nucleotide sequence of yeast 5S RNA

FEBS Lett. 26, 157 - 160, (1972)

Horne, J.R. und Erdmann, V.A.

Isolation and characterization of 5S RNA-protein-complexes from Bac.stearothermophilus and Escherichia coli ribosomes

Mol. Gen. Genet. 119, 337 - 344, (1972)

Horne, J.R. and Erdmann, V.A.

ATPase and GTPase activities associated with a specific 5S RNA-protein-complex

Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.), 70, 2870 - 2873, (1973)

Kaltschmidt, E., Dzionara, M., Donner, D. und Wittmann, H.G.

Ribosomal proteins I Isolation, amino acid composition, molecular weights and peptide mapping of proteins from E.coli ribosomes

Mol. Gen. Genet. 100, 364 - 373, (1967)

Kaltschmidt, E. und Wittmann, H.G.

Ribosomal proteins, XII, Number of proteins in small and large ribosomal subunits of E.coli as determined by two-dimensional gelelectrophoresis

Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.) 67, 1276 - 1280, (1970)

Kearns, D.R. und Wong, Y.P.

Investigation of the secondary structure of Escherichia coli 5S RNA by high-resolution nuclear magnetic resonance

J.Mol. Biol. 87, 755 - 774, (1974)

Jordan, B.R., Galling, G. und Jourdan, R.

Sequence and conformation of 5S RNA from Chlorella cytoplasmic ribosomes: Comparison with other 5S RNA molecules.

J.Mol. Biol. 87, 205 - 225, (1974)

Lewis, J.B. und Doty, P.

Derivation of the secondary structure of 5S RNA from its binding of complementary oligonucleotides
Nature 225, 510 - 513, (1970)

Marotta, C.A., Levy, S.M., Weissman, S.M. und Varricchio, F.
Preferred sites of digestion of a ribonuclease from Enterobacter sp. in the sequence analysis of Bac.stearo-thermophilus 5S RNA

Biochemistry, 12, 2901 - 2904, (1973)

Mirzabekov, A.D. und Griffin, G.E.

5S RNA conformation. Studies of its partial T1 RNase-digestion by gel electrophoresis and two-dimensional thin-layer chromatography.

J.Mol. Biol. 72, 633 - 643, (1972)

Monier, R.

5S RNA Monograph in "Ribosomes"; Nomura, Tissieres, Lengyel; Editors Cold Spring Harbor Laboratory, (1974)
siehe S. 141 - 168

Moore, W.J.

Physical-Chemistry, Fifth Edition,
Longman Ltd., London, (1972)

Nazar, R.N., Sitz, T.O. und Busch, H.

Sequence nomologies in mammalian 5,8S ribosomal RNA.
Biochemistry, 15, 505 - 508, (1976)

Nishikawa, K. und Takemura, S.

Structure and function of 5S ribosomal ribonucleic acid
J. Biochem. (Tokyo) 76, 929 - 934, (1974)

Nomura, M. und Erdmann, V.A.

Reconstitution of 50S ribosomal subunits from dissociated molecular components.

Nature 228, 744 - 747, (1970)

Nomura, M., Tissieres, A., Lengyel, P., Editors
Ribosomes

Cold Spring Harbor Laboratory, (1974)

- Pace, N.R., Pato, M.L., McKibbin, J. und Radcliffe, C.W.
Precursors of 5S ribosomal RNA in Bac.subtilis
J.Mol. Biol. 75, 619 - 631, (1973)
- Peacock, A.C. und Dingmann, W.C.
Resolution of multiple RNA-species by polyacrylamide
gel electrophoresis.
Biochemistry, 6, 1818 - 1827, (1967)
- Pongs, O., Bald, R. und Reinwald, E.
On the structure of yeast tRNA^{Phe} complementary
oligonucleotide binding studies
Eur. J. Biochem. 32, 117 - 125, (1973)
- Pongs, O., Nierhaus, K.H., Erdmann, V.A. und Wittmann, H.G.
Active sites in Escherichia coli ribosomes
FEBS Lett., 40, S28-S37, (1974)
- Pribula, C.D., Fox, G. und Woese, C.R.
Nucleotide sequence of Bac.megaterium 5S RNA
FEBS Lett. 44, 322 - 323, (1974)
- Raacke, J.D.
A model for protein synthesis involving the intermediate
formation of peptidyl 5S RNA
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 68, 2357 - 2361, (1971)
- Rauê, A., Stoof, T.J. und Planta, R.J.
Nucleotide sequence of 5S RNA from Bac.licheniformis
Eur. J. Biochem. 59, 35 - 42, (1975)
- Rosset, R. und Monier, R.
A propos de la présence d'acide ribonucleique de faible
poids moléculaire dans les ribosomes d'E.coli
Ciochem. Biophys. Acta 68, 653 - 656, (1963)
- Rubin, G.M.
The nucleotide sequence of Saccharomyces cerevisiae
5,8S ribosomal ribonucleic acid.
J. Biol. Chem. 248, 3860 - 3875, (1973)

Rubin, G.M. und Hogness, D.S.

Effect of heat shock on the synthesis of low molecular weight RNAs in Drosophila melanogaster:

Accumulation of a novel form of 5S RNA.

Cell, 5, 207 - 214, (1975)

Schettters, H., Gassen, H.G. und Matthaui, H.

Condon-anticodon interaction studied with oligonucleotides containing 3-deazauridine, 4-deoxyuridine or 3-deaza-4-deoxyuridine. I Synthesis by primer-dependent polynucleotide phosphorylase of oligonucleotides containing modified nucleosides.

Biochem. Biophys. Acta 272, 549 - 559, (1972)

Schwarz, G. und Engel, J.

Kinetik kooperativer Konformationsumwandlungen von linearen Biopolymeren

Angew. Chem. 84, 615-623, (1972)

Thach, R.E.

Enzymatic synthesis of oligoribonucleotides of defined sequence

in Procedures in Nucleic Acid Research,

(Cantoni & Davis, eds.) S. 520 - 534, Harper and

Row, Publishers (1966)

Udem, S.A., Kaufman, K. und Warner, J.R.

Small ribosomal ribonucleic acid species of

Saccharomyces cerevisiae

J. Bacteriol. 105, 101-106, (1971)

Udem, S.A. und Warner, J.R.

Ribosomal RNA synthesis in Saccharomyces cerevisiae

J. Mol. Biol. 65, 227 - 242, (1972)

Uhlenbeck, O.C., Baller, J. und Doty, P.

Complementary oligonucleotide binding to the anticodon loop of fMet tRNA

Nature 225, 508-510, (1970)

Uhlenbeck, O.C.

Complementary oligonucleotide binding to tRNA

J. Mol. Biol. 65, 25 - 41, (1972)

Warner, J.R.

The assembly of yeast ribosomes

J. Biol. Chem. 246, 447 - 457, (1971)

Wegenez, M., Monier, R. und Denis, H.

Sequence heterogeneity of 5S RNA in Xenopus laevis

FEBS Lett. 25, 13 - 20, (1972)

Wittmann-Liebold, B.

Studies on the primary structure of 20 proteins from
Escherichia coli ribosomes by means of an improved
sequenator

FEBS Lett. 36, 247 - 250, (1973)

Wittmann, H.G.

The Seventh Sir Hans Krebs Lecture

Structure, function and evolution of ribosomes

Eur. J. Biochem. 61, 1 - 13, (1976)

Woese, C.R., Pribula, C.D., Fox, G.E. und Zablen, L.

The nucleotide sequence of the 5S RNA from a Photobacterium

J. Mol. Evol. 5, 35 - 46, (1975)

Wrede, P. und Erdmann, V.A.

Activities of Bac. stearothermophilus 50S ribosomes
reconstituted with prokaryotic and eukaryotic 5S RNA

FEBS Lett. 33, 315 - 319, (1973)

Wrede, P. und Erdmann, V.A.

Structure and function of the 5S RNA and 5,8S RNA of
yeast.

in Vorbereitung (1976)

Zimmermann, J.

5S RNS-Protein-Komplex aus Bac.stearothermophilus und
E.coli: Vergleich der Basensequenzen in den proteinbin-
denden Regionen

Doktorarbeit, FU Berlin (1975)

Danksagung

Die Arbeit entstand in der Zeit vom Mai 1973 bis zum Januar 1976 im Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin in der Abteilung von Prof. Wittmann.

Herrn Prof. Wittmann danke ich für seine großzügige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Besonders möchte ich Herrn Dr. Volker A. Erdmann für seine Ratschläge und fördernde Kritik sehr herzlich danken, ferner für seine Ermutigungen und Anregungen, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Besonders für seine Erläuterung und Überlassung des 5S RNS-Modells, das sehr hilfreich für die Arbeit war.

Ebenso möchte ich allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe für ihre Hilfe danken, insbesondere Frau Patricia Prokoph für die Präparation der Hefe 5,8S RNS. Frau Huberta Ungewickell und Herrn Klaus Paehlke danke ich für die Durchführung des GTPase-Tests.

Herrn Dr. Olaf Pongs danke ich für seine Einweisung in die Methode der Oligonukleotiddarstellung und Diskussionen.

Ferner sei Herrn Schulz-Harder (Freie Universität Berlin) für seine große Hilfe bei der Darstellung der Hefe 80S Ribosomen gedankt.

Lebenslauf

- 10.6.1948 geboren in Berlin
- 1955 - 60 Besuch der Volksschule in Recklinghausen, NRW
- 1961 - 69 Besuch des mathem.-naturwissenschaftlichen
Hittorf-Gymnasiums in Recklinghausen,
abgeschlossen mit dem Zeugnis der Hochschul-
reife
- 1969 - 74 Studium der Biologie an der Freien Universi-
tät Berlin
- 1971 Diplomvorprüfung
- 1972 Diplomarbeit im Max-Planck-Institut für
Molekulare Genetik, Berlin, Abt. Prof. Witt-
mann, im Labor Dr. Erdmann, angefertigt.
- 1973 Diplomhauptprüfung abgelegt
- 1973 Beginn der Doktorarbeit unter Leitung von
Dr. Erdmann und Dr. Pongs am Max-Planck-
Institut für Molekulare Genetik, Berlin.

difo-druck · 8600 bamberg
untere königstraße 30